



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

Gonçalo Manuel Pinho  
Ribeiro de Oliveira Poças

**Modelos de Neurodegeneração e *Stress* do Retículo  
Endoplasmático em *Drosophila***



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

Gonçalo Manuel Pinho  
Ribeiro de Oliveira Poças

## **Modelos de Neurodegeneração e *Stress* do Retículo Endoplasmático em *Drosophila***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Manuel Dias Neto Domingos, Investigador Auxiliar do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa e do Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à Avó Mita.

Por pela pessoa que é, tanto me influenciar e inspirar  
ao longo de toda a minha vida. É um privilégio ser teu neto!

## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**  
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

**Professor Doutor Carlos Manuel Marques Palmeira**  
Professor Associado, Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra

**Doutor Pedro Manuel Dias Neto Domingos**  
Investigador principal e chefe do Laboratory of Cell Signaling in Drosophila do Instituto de  
Tecnologia Química e Biológica da Universidade nova de Lisboa

**Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares**  
Presidente do Conselho Directivo do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Quero expressar o meu sincero e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para o bom desenvolvimento do meu trabalho.

Ao meu orientador, Doutor Pedro Domingos, um muito obrigado por me integrar na sua equipa e por, desde o início, ter dado todo o seu apoio e confiança, proporcionando-me uma excelente oportunidade de aprendizagem e desenvolvimento de novas competências. Por todas as interessantes e entusiásticas discussões científicas, políticas, gastronómicas, futebolísticas e tenísticas. Por toda a ajuda, atenção, empenho e amizade.

Aos meus colegas de laboratório Vanya, Fátima, Dina, Tânia e Joana que me ajudaram e apoiaram durante este trabalho. Um obrigado especial à Fátima pelas suas qualidades pessoais e profissionais e pelo contributo que deu ao meu trabalho ao longo deste ano. Pelas discussões e análises científicas, pelas opiniões construtivas, pelas úteis e sempre bem-vindas “dicas”, e claro está, pelos maravilhosos biscoitinhos e tiramissús de framboesa.

Aos grupos vizinhos do ITQB e IGC por partilharem equipamentos e reagentes, em particular, ao grupo do Doutor Luís Jaime Mota, por estar sempre pronto a ajudar “na hora certa”.

À Unidade de Imagiologia Celular (UIC) do IGC por todo apoio e ensinamentos prestados. À Bárbara Fekete, pela sua simpatia, disponibilidade e paciência.

À Teresa (Teté), a minha “enviada especial” na UA, ao Renato e à Joana que, mesmo à distância, estiveram sempre dispostos a ajudar e a todos os meus amigos que, de uma forma ou de outra, ajudaram a que este percurso fosse menos difícil.

Aos meus Pais, os principais responsáveis por ter chegado até “aqui” e por ainda ambicionar chegar “mais longe”.

A todos os meus queridos Avós por tanto terem contribuído para aquilo que sou hoje. À Avó Inha, à Avó Mita e Avô Toni. Ao Avô Poças que, esteja onde estiver, estará com certeza muito orgulhoso.

À minha enorme família brasileira, que mesmo com um oceano pelo meio me incentiva, motiva e apoia. Ao Israel, verdadeiro companheiro para todos os bons e maus momentos.

A TODA a minha querida FAMÍLIA por todo o apoio, afecto e compreensão.

A todos,

Muito obrigado.

## palavras-chave

Drosophila, Neurodegeneração, Fotoreceptores, Reticulo Endoplasmático, Ire1, Xbp1, Retinitis Pigmentosa, Doença de Parkinson, Doença de Huntington

## resumo

As doenças neurodegenerativas caracterizam-se por um aumento de morte celular em populações neuronais específicas, que variam dependendo do tipo de doença. A utilização de modelos animais constitui a forma mais eficaz de estudar, *in vivo*, a patofisiologia destas doenças.

Utilizando *Drosophila melanogaster*, vulgarmente designada “mosca da fruta”, como organismo modelo, pretendia-se demonstrar a relevância do *stress* do retículo endoplasmático (RE) e da *Unfolded Protein Response* (UPR) no processo de neurodegeneração. Para isso, foram estudados os mecanismos de protecção vs morte celular induzidos pela via de sinalização Ire1/Xbp1 e procurou-se identificar alvos genéticos desta via.

Neste estudo utilizou-se como ensaio o fenótipo do olho “*glossy*”, obtido pela sobre-expressão de Xbp1<sup>spliced</sup> nas células do olho durante os estádios larvares. Através de um *screen* genético e de análises *microarray* de DNA em células sobre-expressando Xbp1<sup>spliced</sup>, foram identificados dois genes candidatos a alvos genéticos da via Ire1/Xbp1: *sac1* e *ninaA*. Demonstrou-se que a forma mutada de *sac1*, contendo um *p-element* na região reguladora do gene, provoca um agravamento deste fenótipo, aumentando os níveis de neurodegeneração no olho do adulto. Este resultado constitui uma indicação de que *sac1* mutado poderá ser um “*enhancer*” deste fenótipo. No entanto, as mutações pontuais de *sac1*, L2F e L16C, não causaram nenhum efeito significativo sobre este fenótipo. Assim, mais estudos são necessários para clarificar o papel de *sac1* neste contexto de neurodegeneração. Relativamente a *NinaA*, uma chaperone da rodopsina-1, demonstrou-se que a expressão de *ninaA* é afectada pela via Ire1/Xbp1, uma vez, que em células mutantes de Ire1 o nível de expressão deste gene diminuiu drasticamente.

Outra finalidade deste trabalho consistia no desenvolvimento de novos modelos das doenças neurodegenerativas de Parkinson (DP) e Huntington (DH) em *Drosophila*. Recorrendo a técnicas convencionais de clonagem molecular, os cDNAs de proteínas associadas às DP e DH foram clonados em pUAST, um vector de expressão em *Drosophila*. Procedeu-se à expressão destas proteínas em células S2 de *Drosophila*, tendo sido demonstrada a formação de agregados de proteínas, típicos destas patologias. Simultaneamente foram geradas linhas transgénicas de *Drosophila* contendo estes cDNAs e foram mapeados os locais de inserção resultantes do processo de transgénese. Por fim, procedeu-se à expressão dirigida das proteínas de interesse no olho de *Drosophila* e demonstrou-se que a versão mutada da proteína associada à DH, a huntingtina, induz a neurodegeneração da retina.

## keywords

Drosophila, Neurodegeneration, Photoreceptors, Endoplasmic Reticulum, Ire1, Xbp1, Retinitis Pigmentosa, Parkinson's Disease, Huntington's Disease

## abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by an increase in cell death of particular neuronal populations, specific to each illness. The use of animal models constitutes the most powerful research tool to study the pathophysiology of these diseases *in vivo*.

By using *Drosophila melanogaster*, generally known as the fruit-fly, as a model organism, it was intended to demonstrate the significance of the endoplasmic reticulum stress (RE) and of the *Unfolded Protein Response* (UPR) in the process of neurodegeneration. In order to achieve it, the mechanisms of protection vs. cell death through induction of the Ire1/Xbp1 signaling pathway were investigated, along with the search for new genetic targets of this pathway.

The "glossy" eye phenotype, obtained through the expression of Xbp1<sub>spliced</sub> in the eye-cells while in larval stage was used as an assay in this work. Two genes were identified as genetic targets of the Ire1/Xbp1 pathway by performing a genetic screen and a DNA microarray analysis: the *sac1* and the *ninaA* genes. It was shown that *sac1*, a gene coding for a lipid phosphatase, in its mutated form containing a p-element, causes an aggravation of the glossy phenotype, increasing the level of neurodegeneration in the adult fly. Such result indicates that the mutated *sac1* might be an "enhancer" of this phenotype. However, this result was not reproduced with the point mutations in *sac1*, L2F and L16C. Therefore, more studies are required to clarify the role of *sac1* in this context of neurodegeneration. Regarding *NinaA*, a chaperone of rodopsin-1, it was shown that the level of expression of *ninaA* was affected by the Ire1/Xbp1 pathway, as it was drastically decreased in mutant cells for Ire1 gene.

The second aim of this work was to develop new models of neurodegenerative diseases of Parkinson's (PD) and Huntington's (HD) in *Drosophila*. Using conventional molecular cloning techniques, the cDNAs coding for relevant proteins of PD and HD was subcloned to the pUAST plasmid, a *Drosophila* vector. The expression of these relevant proteins in *Drosophila* S2 cells was demonstrated to induce the formation of aggregates. Simultaneously, *Drosophila* transgenic lines carrying the genes of interest were generated and the insertion sites were mapped. Finally, we expressed the proteins of interest specifically in the *Drosophila* eye and it was demonstrated that the mutant form of the protein associated with HD, huntingtin, induces retinal neurodegeneration.

---

## Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Stress</i> do Retículo Endoplasmático.....	1
1.1.1. <i>Unfolded Protein Response</i> .....	1
1.1.2. Via de Sinalização IRE1/Xbp1.....	3
1.2. Doenças Neurodegenerativas Humanas.....	6
1.2.1. Características gerais e impacto na sociedade.....	6
1.2.2. Desenvolvimento de modelos animais.....	6
1.2.3. Neurodegeneração e <i>Stress</i> do RE.....	7
1.2.4. Retinite Pigmentosa e a via de sinalização IRE1/Xbp1.....	9
1.3. Objectivos do Trabalho.....	11
 <b>2. Genes candidatos a moduladores da via IRE1/Xbp1.....</b>	 <b>12</b>
2.1. Introdução.....	12
2.2. Materiais e Métodos.....	14
2.2.1. Manutenção de <i>Drosophila melanogaster</i> em laboratório.....	14
2.2.2. Cruzamentos Genéticos.....	14
i. Recombinação das mutações de <i>Sac1</i> com cromossomas FRT.....	14
ii. Efeito das mutações de <i>Sac1</i> no fenótipo “ <i>glossy</i> ”.....	15
iii. Expressão temporal de <i>ninaA</i> no olho.....	15
iv. Expressão de <i>ninaA</i> em clones mutantes de IRE1 no olho.....	15
2.2.3. Dissecção e Imunohistoquímica de olhos de pupa.....	16
2.2.4. Criosecção de olhos de pupa.....	16
2.2.5. Microscopia das amostras.....	17
2.2.6. Análise da expressão de <i>ninaA</i> por RT-PCR.....	17



---

2.3. Resultados e Discussão.....	18
2.3.1. <i>sac1</i> constitui um possível <i>enhancer</i> da neurodegeneração causada pela sobre-activação da via IRE1/Xbp1.....	18
2.3.2. A activação da expressão de <i>ninaA</i> ocorre entre os 48% e 60% de Pupa.....	19
2.3.3. A transcrição de <i>ninaA</i> é regulada pela via IRE1/Xbp1.....	20
<b>3. Modelos das doenças de Parkinson e Huntington em <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>23</b>
3.1. Introdução.....	23
3.2. Materiais e Métodos.....	26
3.2.1. Clonagem dos cDNAs de interesse em pUAST.....	26
i. Amplificação dos <i>inserts</i> por PCR.....	26
ii. Purificação dos produtos de PCR.....	26
iii. Reacções de restrição.....	26
iv. Electroforese de DNA em gel de agarose.....	26
v. Extracção de DNA em gel de agarose.....	27
vi. Reacções de ligação.....	27
vii. Sequenciação de DNA.....	27
3.2.2. Produção de linhas transgénicas UAS.....	27
3.2.3. Mapeamento das inserções nas linhas UAS.....	27
3.2.4. Expressão das proteínas associadas às DP e DH em células S2.....	28
i. Manutenção de células S2 em cultura.....	28
ii. Transfecção de células S2.....	28
iii. Análise de fluorescência por microscopia confocal.....	29
3.2.5. Expressão das proteínas associadas às DP e DH no olho de <i>Drosophila</i> .....	29

3.3. Resultados e Discussão.....	30
3.3.1. Do processo de transgénese resultaram várias linhas UAS independentes..	30
3.3.2. A expressão das proteínas associadas às DP e DH em células S2 de <i>Drosophila</i> induz a formação de agregados.....	31
3.3.3. A expressão da versão mutada de Huntingtina no olho de <i>Drosophila</i> induz neurodegeneração da retina.....	32
<b>4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Bibliografia.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Anexo.....</b>	<b>45</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Síntese de proteínas no retículo endoplasmático.....	1
<b>Figura 2.</b> As várias vias de sinalização da <i>unfolded protein response</i> (UPR).....	2
<b>Figura 3.</b> Estrutura de domínios do IRE1.....	3
<b>Figura 4.</b> Modelo dos mecanismos envolvidos na activação de IRE1.....	4
<b>Figura 5.</b> A via de sinalização IRE1/Xbp1.....	5
<b>Figura 6.</b> <i>Drosophila</i> como organismo modelo para estudar doenças neurodegenerativas humanas.....	7
<b>Figura 7.</b> Agregados proteicos contendo proteínas <i>misfolded</i> nas doença neurodegenerativas humanas.....	8
<b>Figura 8.</b> A proteína de fusão Xbp1-EGFP como repórter do <i>stress</i> do retículo endoplasmático.....	9
<b>Figura 9.</b> A expressão de Xbp1 <sub>spliced</sub> induz morte celular e degeneração do olho (A-B) e dos fotorreceptores (C-D).....	10
<b>Figura 10.</b> Efeito de mutações em <i>sac1</i> na neurodegeneração do olho causada pela sobreexpressão de Xbp1 <sub>spliced</sub> .....	18
<b>Figura 11.</b> Expressão temporal de <i>ninaA</i> em olhos de pupa com diferentes idades.....	19
<b>Figura 12.</b> Expressão de <i>ninaA</i> em olhos de pupa de 72 h.....	19
<b>Figura 13.</b> Regulação transcricional de <i>ninaA</i> por Xbp1 <sub>spliced</sub> .....	21
<b>Figura 14.</b> Expressão de <i>ninaA</i> em clones de IRE1 <sup>f02170</sup> em olhos de pupa de 55 horas...22	22
<b>Figura 15.</b> Sistema GAL4/UAS para expressão de proteínas em <i>Drosophila</i> .....	25
<b>Figura 16.</b> Clonagem dos cDNA's de interesse em pUAST.....	30
<b>Figura 17.</b> A expressão de proteínas associadas às doenças de Huntington e de Parkinson em células S2 de <i>Drosophila</i> induz a formação de agregados proteicos.....	32
<b>Figura 18.</b> Expressão de proteínas associadas às doenças de Huntington e de Parkinson na retina do olho de <i>Drosophila</i> ( <i>driver</i> GMR).....	33
 <b>Anexo</b>	
<b>Figura 1.</b> Mapas de restrição dos vectores pJET e pUAST.....	46

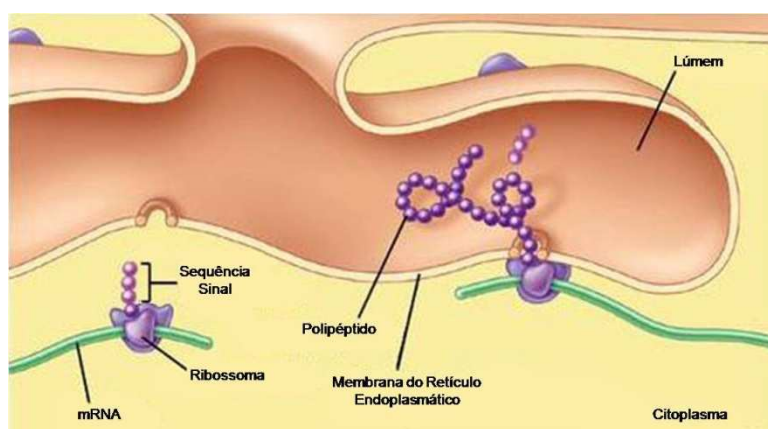


## 1. Introdução Geral

### 1.1. Stress do Retículo Endoplasmático

#### 1.1.1. *Unfolded Protein Response*

O retículo endoplasmático (RE) é um organelo celular presente em todos os organismos eucarióticos, consistindo numa rede membranar onde proteínas secretadas, associadas a membrana ou associadas a organelos, são sintetizadas, processadas e enviadas para vários destinos sub-celulares (Figura 1).

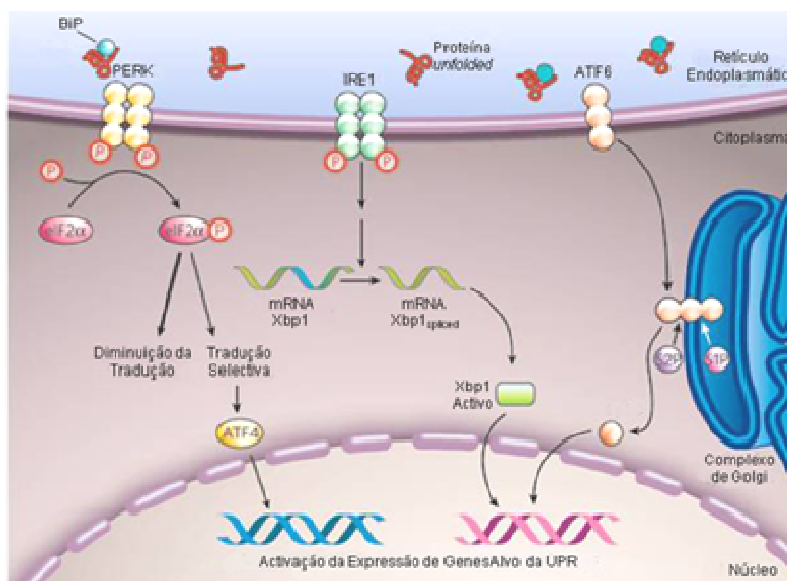


**Figura 1. Síntese de proteínas no retículo endoplasmático.** No retículo endoplasmático ocorre a síntese, *folding* e modificações pós-traducionais das proteínas. Para a síntese é requerido o recrutamento dos ribossomas e a translocação dos polipéptidos nascentes para o lúmen do retículo endoplasmático. Após síntese e correcto *folding* das proteínas, estas são distribuídas para diferentes locais celulares, dependendo da sequência sinal presente no polipéptido.

A tradução destas proteínas ocorre no lúmen do RE e é feita pelos ribossomas localizados na superfície citosólica do RE<sup>1-2</sup>. Embora a tradução das proteínas seja iniciada no citosol, a aquisição de uma estrutura secundária correcta apenas ocorre à medida que o polipéptido é alongado e translocado para o interior do lúmen do RE. A estrutura tridimensional que as proteínas adquirem depende das características e sequência dos aminoácidos que as constituem e de modificações pós-traducionais que contribuem para o seu correcto *folding*, tais como, a adição de hidratos de carbono (glicosilação), isomerização *cis-trans* das ligações peptídicas e a formação de pontes dissulfeto<sup>3</sup>. Várias chaperones moleculares e enzimas ajudam no *folding* das proteínas no RE. Uma das chaperones moleculares mais importantes é a Bip/GRP78 (*Binding Protein/Glucose Regulated Protein 78* – Hsc3, em

*Drosophila*), que ajuda a estabilizar proteínas num estágio intermediário do seu *folding*, através da sua ligação a regiões hidrofóbicas da proteína *unfolded* ou incompletamente *folded*, impedindo a interacção destas proteínas com as moléculas circundantes<sup>4-5</sup>.

A ocorrência de mutações e/ou *stress* celular, que perturbam os níveis de energia e alteram o estado redox, causam uma redução da capacidade de *folding* do RE. Além disso, pode ocorrer uma situação em que a célula sofre um aumento excessivo da quantidade de proteínas a serem sintetizadas no RE, excedendo a capacidade de *folding* deste organelo. Nestes casos, poderá ocorrer uma acumulação de proteínas *unfolded/misfolded* no RE, alterando o normal transporte de proteínas pela via secretora e causando “*stress* do RE”<sup>6</sup>. A acumulação de proteínas *unfolded* no RE desencadeia uma resposta, evolutivamente conservada em todos os eucariotas, designada *unfolded protein response* (UPR), que consiste num mecanismo homeostático que evoluiu para detectar a presença de proteínas *misfolded* no RE, combater o *stress* do RE e restaurar o normal funcionamento do RE<sup>7-8</sup>. No RE de todos os mamíferos, estão presentes três proteínas transmembranares que funcionam como sensores moleculares do *stress* do RE, detectando a acumulação de proteínas *misfolded* e desencadeando a UPR: *Pancreatic ER kinase* (PKR)-like *ER kinase* (PERK), *Activating transcription factor 6* (ATF6) e *Inositol-requiring enzyme 1* (Ire1) (Figura 2).



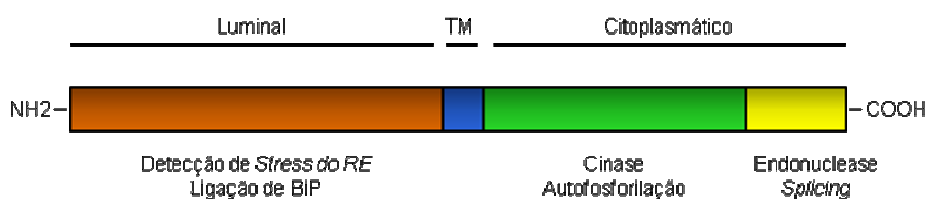
**Figura 2. As várias vias de sinalização da *unfolded protein response* (UPR).** Representação esquemática das três principais vias de sinalização envolvidas na resposta ao *stress* do retículo endoplasmático. As proteínas IRE1, PERK e ATF6 estão ancoradas à membrana do retículo endoplasmático e funcionam como sensores moleculares, detectando o *stress* causado pela acumulação de proteínas *misfolded* no lúmen do retículo endoplasmático. Em condições de *stress* elas são activadas e iniciam uma cascata de sinais de transdução, induzindo a expressão de vários genes responsáveis pelo restabelecimento da homeostasia do retículo endoplasmático. Adaptado de <sup>9</sup>.

Durante a UPR ocorre a activação de um conjunto de vias de sinalização que, resumidamente, conduzem a uma diminuição da quantidade de proteínas *misfolded* no RE e a uma atenuação geral dos níveis de tradução de proteínas, diminuindo a quantidade de proteínas no lúmen do RE. Durante este processo, ocorre a activação transcricional de chaperones do RE e de outras enzimas envolvidas no *folding* das proteínas, com subsequente aumento da capacidade de folding do RE. Além disso, ocorre a activação da transcrição de genes que codificam a maquinaria de retrotranslocação e degradação de proteínas *misfolded* acumuladas no RE<sup>8,10-11</sup>. A UPR é uma resposta fisiológica que visa a manutenção da integridade e sobrevivência das células sujeitas a *stress* do RE. Contudo, quando o *stress* do RE é demasiado severo e/ou prolongado, o mecanismo de UPR pode não ser capaz de “neutralizar” as agressões induzidas pelo *stress* do RE à célula, acabando por induzir apoptose, uma forma de morte celular programada<sup>12</sup>.



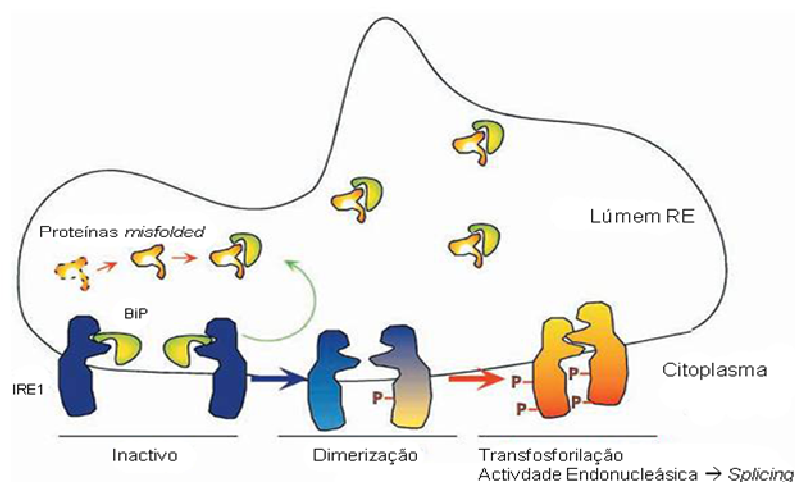
### 1.1.2. Via de sinalização IRE1/Xbp1

A via de sinalização mediada por IRE1 é a mais conservada filogeneticamente dentre as vias de UPR, tendo sido já descritos vários genes homólogos de IRE1 em plantas, *C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos<sup>13-20</sup>. IRE1 é uma proteína transmembranar do tipo I, com aproximadamente 100 KDa, que possui dois domínios distintos: o domínio luminal, envolvido no reconhecimento de proteínas *misfolded* e o domínio citoplasmático, com actividades de cinase e endoribonuclease (Figura 3).



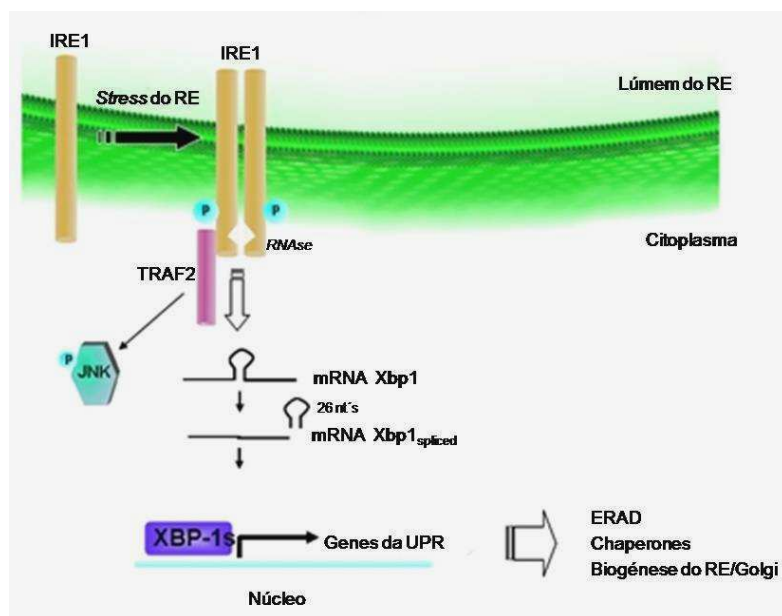
**Figura 3. Estrutura de domínios do IRE1.** Representação esquemática dos diferentes domínios de IRE1. O domínio luminal (laranja) detecta o *stress* do retículo endoplasmático e constitui o local onde a chaperone BiP se liga. O domínio transmembranar – TM (azul) permite a ancoragem de IRE1 à membrana do RE. No domínio citoplasmático a região com actividade de cinase (verde) autofosforila IRE1, e a região com actividade de endonuclease (amarelo) promove o *splicing* do mRNA de Xbp1. Adaptado de <sup>21</sup>.

O mecanismo pelo qual IRE1 reconhece proteínas *misfolded* presentes no lúmen do RE é ainda alvo de grande debate. O primeiro modelo a ser proposto continua a ser largamente aceite e defende que a chaperone BiP funciona como um regulador negativo da activação de IRE1. Na ausência de *stress* do RE, a chaperone do RE BiP encontra-se ligada ao domínio luminal de IRE1, mantendo-o num estado inactivo. Perante uma situação de *stress*, induzida pela acumulação de proteínas *misfolded* no RE, BiP é recrutada para promover o folding destas proteínas, dissociando-se de IRE1 e permitindo, desta forma, a dimerização e activação de IRE1<sup>22-23</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Modelo dos mecanismos envolvidos na activação de IRE1.** BiP ligada ao domínio luminal de IRE1 mantém este sensor molecular como monómeros num estado inactivo. A acumulação de proteínas *misfolded* no lúmen do retículo endoplasmático estimula a desassociação de BiP do domínio luminal de IRE1, permitindo a sua dimerização, transautofosforilação e activação das suas funções endonucleásicas que resultam no *splicing* do mRNA de Xbp1. Adaptado de <sup>21</sup>.

Contudo, outros estudos demonstraram que o domínio de IRE1 onde BiP se liga é dispensável para a activação de IRE1 induzida por *stress* do RE<sup>23-24</sup>. Um modelo alternativo para explicar a capacidade de reconhecimento de proteínas *misfolded* no RE pelo IRE1 propõe que este interage e reconhece directamente as proteínas *misfolded* através do sulco que se forma após oligomerização dos domínios luminais de IRE1<sup>25</sup>. De qualquer forma, está comprovado que a activação de IRE1, em condições de *stress* do RE, ocorre por oligomerização e autofosforilação dos seus monómeros, levando à activação do seu domínio com actividade de endoribonuclease<sup>26-29</sup>. Este domínio promove a clivagem do mRNA que codifica o factor de transcrição Hac1<sup>30-32</sup>, no caso das leveduras, ou o seu homólogo Xbp1 (*X-box-binding protein 1*), nos metazoários<sup>33-35</sup>. No caso de Xbp1, o IRE1 activo remove um intrão de 26 nucleótidos, induzindo um *frame-shift* (alteração da grelha de leitura dos codões) na tradução de Xbp1 e criando um novo domínio C-terminal nesta forma *spliced* do Xbp1 (Xbp1s)<sup>34-35</sup> (Figura 5).



**Figura 5. A via de sinalização IRE1/Xbp1.** Após detectar *stress* do retículo endoplasmático, IRE1 é activado por dimerização e autofosforilação. IRE1 activo possui actividade endonucleásica e promove o *splicing* do mRNA de Xbp1, removendo um intrão de 26 nucleótidos. A remoção deste intrão provoca uma alteração da grelha de leitura dos códones do mRNA de Xbp1, permitindo a produção de um factor de transcrição funcional, Xbp1<sub>spliced</sub> (Xbp1s), que no núcleo activa a expressão de vários genes associados à UPR.

O *splicing* do mRNA de Xbp1 é essencial, pois apenas após a remoção dos 26 nucleótidos é que ocorre a tradução de um factor de transcrição activo. Xbp1s é um potente factor de transcrição, da família *basic-leucine zipper* (B-ZIP), que induz a expressão de chaperones do RE e outros genes da UPR envolvidos no restauro da capacidade de *folding* e degradação de proteínas do RE (ERAD)<sup>36-38</sup>.

Ao contrário do que ocorre em levedura, nos mamíferos e em *Drosophila* o mRNA de Xbp1 não é o único substrato de IRE1. Através da activação de IRE1, além do *splicing* de Xbp1, ocorre também uma degradação de todos os mRNAs dirigidos para tradução no RE promovendo, desta forma, uma diminuição da sobrecarga de proteínas no RE em condições de *stress* do RE<sup>17</sup>. Além disso, o domínio citosólico de IRE1 de mamíferos interage com Traf2 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 2*), um activador da via de sinalização de *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), estando assim também envolvido na activação de vias que induzem apoptose após *stress* do RE<sup>39</sup> (Figura 5).

## 1.2. Doenças Neurodegenerativas Humanas

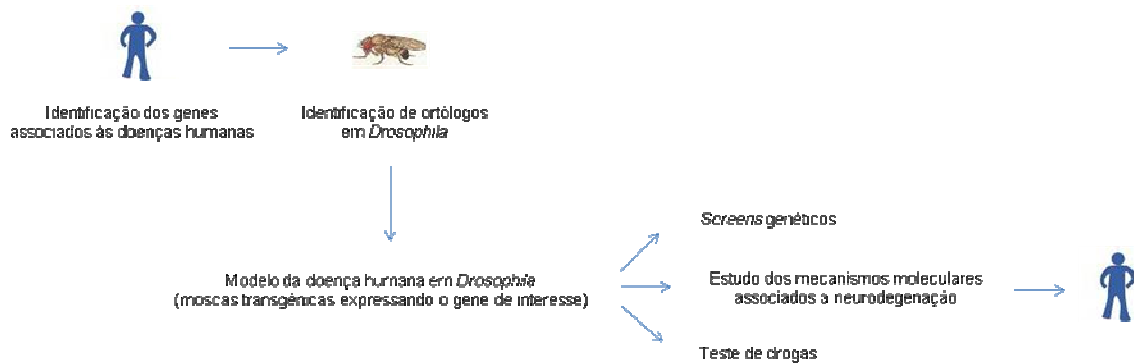
### 1.2.1. Características gerais e impacto na sociedade

Os avanços alcançados na área da biomedicina nas últimas décadas permitiram uma enorme melhoria da saúde humana, aumentando de uma forma dramática a expectativa de vida das populações. Uma consequência negativa inesperada destes avanços consistiu no aumento significativo do número de doenças relacionadas com o processo de envelhecimento, em particular as doenças neurodegenerativas. As doenças neurodegenerativas humanas são desordens progressivas do sistema nervoso que afectam a função e manutenção de populações neuronais específicas, constituindo um enorme desafio para os investigadores em biomedicina. A maioria destas doenças partilha várias características comuns, tais como: acumulação de proteínas *misfolded* e perda progressiva de populações neuronais específicas, origem predominantemente esporádica e de início tardio, ausência de sintomas durante os primeiros estádios da doença, perda de memória, defeitos cognitivos e afectivos, desordens do movimento e morte precoce. As doenças neurodegenerativas, chegaram a ser consideradas, no passado, como sendo das mais obscuras e intratáveis doenças humanas. Felizmente, este cenário tem vindo a mudar nos últimos anos com o avanço de áreas como a genética humana e genómica que permitiram a identificação de alguns dos genes associados às formas familiares de doenças como a doença de Parkinson (DP) e doença de Huntington (DH). No entanto, as doenças neurodegenerativas continuam a contribuir significativamente para a morbilidade e mortalidade no mundo desenvolvido. Os efeitos que estas doenças têm sobre os pacientes e seus familiares são devastadores, quer a nível físico, quer a nível psicológico. Além disso, as doenças neurodegenerativas têm um elevado impacto económico na sociedade, contribuindo fortemente para a despesa anual que os vários estados dispendem na saúde.

### 1.2.2. Desenvolvimento de Modelos Animais

A identificação e clonagem molecular dos genes associados às formas hereditárias das doenças neurodegenerativas permitiu que se passasse a estudar estas patologias a um nível molecular. Além disso, permitiu o desenvolvimento de modelos animais para estas doenças que são essenciais, quer para estudar as fases pré-sintomáticas da patogénese, quer para testar novos compostos candidatos a drogas. De facto, o estabelecimento de modelos animais constitui uma das formas mais poderosas e eficazes de estudar os mecanismos

patogénicos destas doenças ao nível molecular e celular. Nos últimos anos, *Drosophila melanogaster*, vulgarmente designada “mosca da fruta”, tem provado ser um excelente sistema biológico para modelar doenças neurodegenerativas humanas<sup>40</sup> (Figura 6).

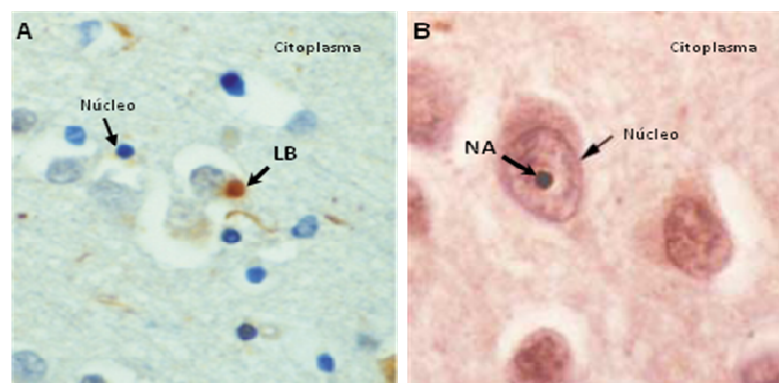


**Figura 6. *Drosophila* como organismo modelo para estudar as doenças neurodegenerativas humanas.** Adaptado de <sup>41</sup>.

Vários aspectos contribuem para que este organismo seja tão atractivo, tais como, uma manutenção em laboratório fácil e pouco dispendiosa, um ciclo de vida curto e elevada fertilidade, anatomia bem caracterizada e a imbatível bateria de “ferramentas genéticas” disponível. Além disso, foi demonstrado que apesar do genoma de *Drosophila* ser relativamente pequeno, possui um elevado grau de conservação em relação aos mamíferos, uma vez que 75% dos loci associados a doenças em humanos têm pelo menos um ortólogo em *Drosophila*<sup>42</sup>.

### 1.2.3. Neurodegeneração e *Stress* do RE

As proteínas que não adquirem a sua estrutura nativa poderão perder a sua função fisiológica, agregar e acumular em estruturas insolúveis. Uma vez que as formas familiares das doenças neurodegenerativas resultam de mutações em proteínas específicas que se acumulam como proteínas *misfolded* e escapam aos mecanismos de degradação, é razoável considerar que o *stress* do RE desempenha um papel importante na patogénese destas doenças. De facto, a formação de agregados contendo proteínas *misfolded* é bastante comum e está envolvida na etiologia da maior parte das doenças neurodegenerativas humanas<sup>43</sup> (Figura 7).



**Figura 7. Agregados proteicos contendo proteínas *misfolded* nas doenças neurodegenerativas humanas.**

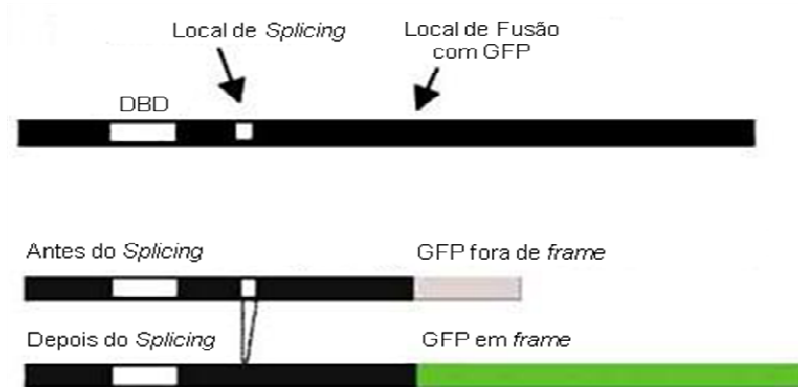
**A)** Tecido de um paciente com doença de Parkinson contendo *Lewy bodies* (LB), inclusões citoplasmáticas imunoreactivas para  $\alpha$ -sinucleína, a proteína mais relevante nesta doença. **B)** Tecido de um paciente com doença de Huntington exibindo agregados nucleares (NA), típicos desta doença. Adaptado de <sup>44</sup>.

Estes agregados depositam-se no interior das células ou em espaços extracelulares, formando corpos de inclusão ou placas microscopicamente visíveis que têm uma enorme tendência para interagir com vários alvos celulares, induzindo toxicidade celular<sup>45</sup>. Além disso, a acumulação de agregados contendo proteínas *misfolded*, provoca, de uma forma indirecta, a acumulação de proteínas *unfolded* no RE. Pensa-se que tal facto ocorra devido a uma saturação da capacidade de degradação via proteossoma, causando uma acumulação adicional de proteínas *unfolded* dirigidas para ubiquitinação e degradação via translocação retrógrada do RE para o citosol<sup>46-47</sup>.

Diferentes estudos têm obtido resultados que evidenciam o provável envolvimento do *stress* do RE nas doenças neurodegenerativas, nomeadamente estudos com modelos celulares da DP, onde se demonstrou a ocorrência de *stress* do RE e um aumento da expressão de genes associados à UPR<sup>48-49</sup>. Adicionalmente, demonstrou-se que a acumulação de  $\alpha$ -sinucleína, típica da DP, causa o bloqueio do transporte vesicular entre o RE e o Complexo de Golgi<sup>46</sup>. Alguns dos resultados obtidos suportam a noção de que a UPR inicial deverá ser neuroprotectora, no entanto, um continuado *stress* do RE conduz a um aumento da expressão de genes cujos produtos induzem morte celular. Serão necessários mais estudos para determinar se nas doenças neurodegenerativas é, de facto, induzido *stress* do RE e analisar qual a sua relevância na progressão da patologia.

#### 1.2.4. Retinite Pigmentosa e a via de sinalização IRE1/Xbp1

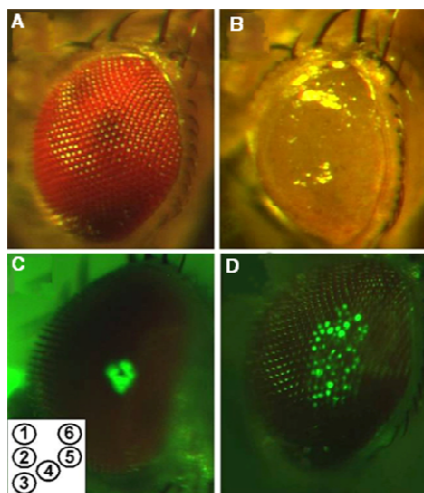
A doença neurodegenerativa humana Retinite Pigmentosa Autossômica Dominante (RPAD) consiste numa degeneração progressiva dos fotorreceptores na qual os indivíduos afectados sofrem, geralmente, de cegueira noturna, seguida por perda da visão central e periférica<sup>50</sup>. Cerca de 30% dos casos de RPAD, são causados por mutações no gene da rodopsina humana, a proteína sensível à luz presente nos fotorreceptores. Mutações equivalentes, no gene homólogo de *Drosophila* (*ninaE*), codificando Rodopsina 1, também resultam numa degeneração progressiva da retina. A Rodopsina 1 apresenta uma homologia de 22% na sequência de aminoácidos com a rodopsina humana. A ocorrência de mutações nas regiões transmembranar ou extracelular de Rodopsina 1 interfere com o seu *folding* normal, causando *stress* no RE com posterior degeneração dos fotorreceptores<sup>51-54</sup>. No entanto, continuam por identificar os mecanismos que induzem a activação da apoptose neste contexto. Recentemente, foi demonstrado que a via de sinalização IRE1/Xbp1 tem um papel relevante num modelo de RPAD em *Drosophila*, contribuindo para a protecção da retina contra a degeneração<sup>55</sup>. Neste estudo, foram utilizados vários alelos de *ninaE*, com características moleculares e fenotípicas idênticas às encontradas na RPAD e provou-se que Xbp1 tem um papel protector contra a degeneração da retina. Para isso, desenvolveu-se a proteína de fusão Xbp1-GFP, na qual GFP foi clonada de uma forma em que a sua grelha de leitura apenas está em *frame* com a de Xbp1 após o *splicing* mediado por IRE1, em condições de *stress* do RE (Figura 8).



**Figura 8. A proteína de fusão Xbp1-EGFP como repórter do *stress* do retículo endoplasmático.** O cDNA de GFP foi clonado a 3' do local de *splicing*, produzindo uma proteína de fusão em que GFP apenas está em *frame* após ocorrer o *splicing* mediado por IRE1, em condições de *stress* do retículo endoplasmático. Adaptado de <sup>55</sup>.

Este reagente, Xbp1-GFP funciona como um “repórter” do *stress* do RE e da activação de UPR via IRE1. Nas mutações dominantes de *ninaE* ocorre activação de Xbp1-GFP, o que implica que a via de sinalização mediada por IRE1 e Xbp1 é activada nos mutantes de Rodopsina 1, que exibem degeneração da retina.

Contudo, a expressão transgénica da forma activa de Xbp1 (Xbp1<sub>spliced</sub>) em *Drosophila*, induz morte celular e degeneração, quer no olho em desenvolvimento durante os estádios larvares, quer nos fotorreceptores diferenciados do olho no organismo adulto, produzindo o fenótipo designado “*Glossy*” (Figura 9).



**Figura 9.** A expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> induz morte celular e degeneração do olho (A-B) e dos fotorreceptores (C-D). **A)** Olho controlo. **B)** Olho adulto exibindo o fenótipo “*glossy*” causado pela expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> durante os estádios de larva. **C)** Olho control exibindo uma “*pseudopupil*”, a projecção resultante da expressão de GFP nos fotorreceptores externos. Representação esquemática dos fotorreceptores (1-6). **D)** A expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> nos fotorreceptores causa degeneração, evidenciada pela degradação da imagem da “*pseudopupil*”, onde apenas se observa luz dispersa do GFP.

Este resultado paradoxal leva-nos a levantar a hipótese de que o *timing* e duração da activação de Xbp1<sub>spliced</sub>, são importantes para a definição do resultado final, protecção ou morte. Isto é, a activação de Xbp1 durante breves períodos de tempo poderá ter efeitos protectores, enquanto que a sua permanente activação leva a diferentes respostas celulares induzindo morte e degeneração. Desta forma, mais estudos são necessários para esclarecer o papel da via IRE1/Xbp1 na indução de protecção/morte nas doenças neurodegenerativas, em geral, e na ADRP, em particular.



### 1.3. Objectivos do Trabalho

Apesar de há vários anos se dedicar especial atenção ao estudo das causas da morte celular típica das doenças neurodegenerativas, pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares que estão na sua base. A ocorrência de *stress* do Retículo Endoplasmático (RE) em modelos celulares de doenças neurodegenerativas foi já demonstrada em diferentes estudos. No entanto, continua por esclarecer qual a sua relevância e grau de envolvimento na origem e progressão destas doenças. Neste trabalho, ao estudar os mecanismos de protecção vs. morte celular induzidos pela via de sinalização Ire1/Xbp1 num modelo de *Retinitis pigmentosa* em *Drosophila*, pretendíamos obter resultados experimentais que contribuíssem para a clarificação da relevância do *Stress* do RE e da *Unfolded Protein Response* (UPR) no processo de neurodegeneração. Para isso, propusemo-nos atingir os seguintes objectivos específicos:

- Identificar novos genes cuja expressão é activada pela via de sinalização IRE1/Xbp1;
- Analisar a capacidade destes genes inibirem/agravarem o processo de neurodegeneração;

Adicionalmente, pretendíamos desenvolver novos modelos das doenças de Parkinson (DP) e de Huntington (DH) em *Drosophila*, tendo, para isso, estabelecido os seguintes objectivos:

- Criar os novos reagentes UAS-Huntingtin:GFP e UAS- $\alpha$ Synuclein:GFP;
- Estabelecer linhas transgénicas contendo os reagentes UAS integrados no seu genoma
- Validar, *in vitro* e *in vivo*, os novos modelos das DP e DH em *Drosophila*.

## 2. Genes candidatos a moduladores da via IRE1/Xbp1

### 2.1. Introdução

O trabalho anterior desenvolvido pelo Doutor Pedro Domingos conduziu à identificação de vários genes candidatos a moduladores da via IRE1/Xbp1. A identificação destes genes resultou de uma análise comparativa *microarray* da expressão de genes presentes no olho de *Drosophila* sobre-expressando Xbp1<sub>spliced</sub>. Esta análise foi efectuada a partir de RNA total extraído de discos imaginais do olho e antena de larvas no 3º estágio de desenvolvimento sobre-expressando Xbp1<sub>spliced</sub> (Genótipo: *GMRGal4* ; *UASXbp1<sub>spliced</sub>/TM6B*). O resultado desta análise foi uma lista de genes cuja expressão sofre um aumento significativo nas condições acima referidas (parte dessa lista está disponível na Tabela 1 do **Anexo**). Deste conjunto de genes, seleccionámos um para ser estudado no âmbito desta tese de mestrado: *ninaA*.

Adicionalmente, o Doutor Pedro Domingos desenvolveu um *screen* preliminar de genes capazes de alterar o fenótipo “*glossy*”, tendo identificado *sac1*.

De seguida, faz-se uma breve descrição das principais funções biológicas destes genes, justificando a sua escolha como candidatos a moduladores da via de sinalização IRE1/Xbp1.

NinaA é uma proteína integral de membrana da família das ciclofilinas expressa especificamente nas células fotoreceptoras e é necessária à biogénese da rodopsina 1 (Rh1), o principal pigmento visual de *Drosophila*<sup>56</sup>. Foi demonstrado que NinaA é uma chaperone de Rh1, uma vez que, em mutantes de *ninaA*, a Rh1 acumula-se no RE, não sendo transportada para o rabadómero e conduzindo a uma dramática redução dos níveis de Rh1<sup>51,57</sup>. Sendo uma ciclofilina, NinaA tem a actividade de *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, fundamental para a correcta síntese, *folding*, estabilidade e transporte da Rh1<sup>58</sup>. Assim, *ninaA* constitui um gene de interesse no estudo de moduladores da indução da apoptose resultante da activação da via de sinalização IRE1/Xbp1, em condições de *stress* do RE.

Sac1 é uma fosfatase de lípidos que desfosforila vários fosfoinosítídeos (PIs). Os PIs são importantes reguladores de diversos processos celulares, tais como, organização do citoesqueleto, tráfico vesicular, apoptose, proliferação e diferenciação<sup>59</sup>. Estudos anteriores demonstraram que, em levedura, Sac1 regula a organização da actina do citoesqueleto e a secreção. Em *Drosophila*, demonstrou-se que Sac1 regula a forma das células e a cascata JNK durante a *dorsal closure*<sup>60</sup>, sendo que, Sac1 mutada induziu a activação da via de sinalização JNK em regiões da epiderme onde normalmente estava inactiva, sugerindo um papel repressor para Sac1 nesta via. A via de sinalização JNK envolve as *c-Jun NH2-terminal kinases* (JNK) que constituem um sub-grupo das *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). As vias de sinalização mediadas pelas MAPK amplificam e integram sinais provenientes de uma grande diversidade de estímulos extracelulares, controlando a resposta genómica e fisiológica da célula às alterações ambientais. As JNK são activadas principalmente por citocinas e pela exposição a condições de *stress*. A activação da via JNK é necessária durante a morfogénese embrionária e contribui para a regulação da proliferação celular e apoptose. Uma vez que, Sac1 é uma proteína reguladora negativa (repressor) da via de JNK e que, esta via tem a capacidade de induzir apoptose, é plausível pensar-se que *sac1* poderá ter um efeito modelador no processo de neurodegeneração decorrente da sobre-activação da via IRE1/Xbp1 após severo *stress* do RE.

De forma a testar este possível efeito modulador de *sac1* foram utilizadas 3 formas mutadas de *sac1*: pSac1, que consiste numa inserção de um *p-element* na região reguladora de *sac1*, Sac1<sup>L2F</sup>, que consiste numa forma truncada da proteína provocada pela mutação *missense* W438Stop, e Sac1<sup>L16C</sup>, identificada por Wei e colaboradores<sup>60</sup>, mas sem descrição disponível.

## 2.2. Materiais e Métodos

### 2.2.1. Manutenção de *Drosophila melanogaster* em laboratório

As linhas de *Drosophila* utilizadas neste trabalho foram mantidas em recipientes (tubos ou garrafas) contendo alimento à base de farinha de milho, açúcar, melaço, ágar e nipagina 10% (em etanol) e incubadas em câmaras com condições de temperatura, humidade e luz controladas. Foram utilizadas duas temperaturas de incubação: 18°C, para a preservação dos stocks, e 25°C, durante os cruzamentos. O ciclo circadiano constava de 12h.

### 2.2.2. Cruzamentos Genéticos

Para obter as moscas contendo os genótipos de interesse, foram efectuados diferentes cruzamentos, tendo em conta as características da genética de *Drosophila*. De seguida, é feita uma breve explicação dos cruzamentos e dos genótipos utilizados. Descrições esquemáticas com informações detalhadas destes cruzamentos encontram-se no **Anexo**.

#### i. Recombinação das mutações de *Sac1* com cromossomas FRT

Para poder testar o efeito das mutações em *sac1* no processo de neurodegeneração induzido pela sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> (descrito na secção seguinte), foi necessário recombinar previamente as mutações com cromossomas contendo regiões *flipase recombination target* (FRT). Estas regiões FRT são essenciais para permitir a geração de clones de células contendo duas cópias (homozigóticas) da forma mutada de *sac1* no olho da mosca e assim testar o efeito sobre o fenótipo “*glossy*”. O cruzamento final para obtenção das mutações de *sac1* recombinadas com FRT consistiu em cruzar fêmeas virgens contendo estas mutações e as regiões FRT inseridas em cromossomas homólogos distintos (Genótipos: *w* ; ; *FRT80B/Sac1*<sup>L16C</sup> e *w* ; ; *FRT80B/Sac1*<sup>L2F</sup>) com machos contendo os cromossomas II e III balanceados (Genótipo: *w/y* ; *Sco/Cyo* ; *Sb/TM6B*). Durante a gametogénese destas fêmeas ocorre recombinação meiótica podendo gerar gâmetas contendo as mutações em *sac1* e as regiões FRT recombinadas no mesmo cromossoma. Para confirmar a ocorrência desta recombinação procedeu-se à realização de dois cruzamentos teste. Um cruzamento baseado no efeito de letalidade, para confirmar a presença de *sac1* mutado, uma vez que indivíduos homozigóticos para *sac1*

mutado são inviáveis. O outro cruzamento baseado na geração de mosaicos, para confirmar a presença das regiões FRT (ver **Anexo**)

### **ii. Efeito das mutações de *Sac1* no fenótipo “glossy”**

Após a obtenção das recombinações de *sac1* mutado procedeu-se ao teste do efeito destas mutações sobre o fenótipo “glossy”. Além destas mutações de *sac1*, foi também testado o efeito da forma mutante p*Sac1*<sup>L2049</sup>, obtida a partir de *Kyoto Stock Center*. Para isso, realizou-se o cruzamento entre machos contendo as mutações recombinadas de *Sac1*, obtidas no passo anterior e a forma mutante p*Sac1*<sup>L2049</sup> (Genótipos: *w ; ; FRT80B/Sac1*<sup>L16C</sup> , *w ; ; FRT80B/Sac1*<sup>L2F</sup> e p*Sac1*<sup>L2049</sup>), com fêmeas virgens exibindo o fenótipo “glossy” originado pela sobreexpressão de *Xbp1<sub>spliced</sub>* no olho (Genótipo: *eyFlp GMRGal4 UASXbp1<sub>spliced</sub>/FM7 ; ubiGFP FRT80B/TM6B*). Na progenia deste cruzamento analisou-se a ocorrência de alterações de fenótipo, tendo em conta características como tamanho do olho e grau de degeneração da retina.

### **iii. Expressão temporal de *ninaA* no olho**

Para analisar a expressão temporal do gene da chaperone *NinaA* no olhos, isto é, determinar o momento do desenvolvimento no qual se inicia a sua expressão, utilizámos indivíduos contendo uma inserção do gene repórter *lacZ* sob controlo do promotor de *ninaA* (Genótipo: *w; P[ninaALacZ]/Cyo; Sb/TM6B*). Os indivíduos com este genótipo foram obtidos a partir de *Bloomington Drosophila Stock Center*. O *staging* das pupas (obtenção de pupas com determinado grau de desenvolvimento) consistiu em recolher pré-pupas (0h de desenvolvimento na pupa) e incubá-las a 25°C, durante períodos definidos de tempo, de forma que as pupas atingissem a idade pretendida<sup>61</sup>.

### **iv. Expressão de *ninaA* em clones mutantes de IRE1 no olho**

Nesta fase do trabalho, pretendia-se analisar se a expressão de *ninaA* é afectada em células homozigóticas de IRE1 mutado. Desta forma, foi necessário gerar clones mutantes de IRE1 no olho. Utilizando a técnica de Flipase/FRT que permite a recombinação mitótica entre locais específicos de cromossomas homólogos e a obtenção de mosaicos<sup>62</sup>. A enzima flipase foi expressa no olho sob controlo do

promotor de *eyeless* (*ey*)<sup>63</sup>. O cruzamento final (ver **Anexo**) consistiu em cruzar machos a expressar simultaneamente o gene repórter *lacZ*, sob controlo do promotor de *ninaA* e a versão mutada IRE1<sup>f02170</sup>, contendo uma inserção letal do transposão *PBac*<sup>64</sup> na sequência codificante de IRE1 (Genótipo: *w/y* ; *Sco/Cyo* ; *FRT82BPBac*<sup>64</sup>*ire1*<sup>f02170</sup>/*TM6B*), com fêmeas virgens a expressar *pWIZ-wΔ13*, que consiste num RNAi contra o mRNA do gene *white*, e GFP recombinado num cromossoma FRT (Genótipo: *eyFlp* ; *pWIZ-wΔ13/Cyo* ; *FRT82BubiGFP/TM6B*). Desta forma, foi possível marcar os clones de células homozigóticas para a mutação de IRE1 pela ausência de GFP. O alelo mutante IRE1<sup>f02170</sup> foi obtido a partir de *Bloomington Drosophila Stock Center*. A inserção de *pWIZ-wΔ13* é importante para diminuir a auto-fluorescência do pigmento vermelho do olho, presente nas pupas em fases mais tardias do desenvolvimento, o qual interfere com a análise de fluorescência das amostras.

### 2.2.3. Dissecção e Imunohistoquímica de olhos de pupa

Na dissecção dos olhos de pupa, de diferentes idades, seguiu-se o protocolo descrito por Pichaud<sup>65</sup>. Os olhos foram dissecados em PBS 1X e fixados em solução de fixação (PBS 1X, formaldeído 4%) durante 20 min, à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se a 3 lavagens, de 10 min cada, com PBT (PBS 1X, Triton-X 0,3%), à temperatura ambiente. Para imunomarcação, as amostras foram incubadas nos anticorpos primários diluídos em PBT, durante 16h-18h, a 4°C e com agitação constante. Seguiram-se 3 lavagens de 10 min cada, em PBT à temperatura ambiente. As amostras foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado durante 2h com agitação, à temperatura ambiente. Repetiram-se três lavagens, de 10 min cada, em PBT.

### 2.2.4. Criosecção de olhos de pupa

O procedimento utilizado na obtenção de criosecções (secções congeladas) de olhos de pupa foi o seguinte: as cabeças foram embebidas no composto O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature* ; Tissue Tek) e procedeu-se ao seu rápido congelamento a -20°C. De seguida, as amostras foram seccionadas num crióstato (Microm HM 550) em fatias com 10µm de espessura, transferidas para lâminas de vidro e fixadas em solução de

fixação (PBS 1X + formaldeído 4%) durante 20 min. Por fim, procedeu-se à imunomarcação das criosecções seguindo o mesmo procedimento descrito para a imunohistoquímica de olhos de pupa.

### 2.2.5. Microscopia das amostras

Após a transferência das amostras para lâminas de vidro adicionou-se glicerol 70% como meio de montagem e aplicou-se uma lamela de vidro. Na montagem dos olhos de pupa mais desenvolvidos (pupas de 60 h e 72 h), fez-se uma ponte formada por 3 lamelas, de forma a evitar o seu esmagamento.

Para a observação das amostras, utilizou-se um microscópio confocal invertido da Zeiss, modelo LSM 510 Meta. A aquisição de imagens foi efectuada com o software Zeiss SP 2 versão 4.0.

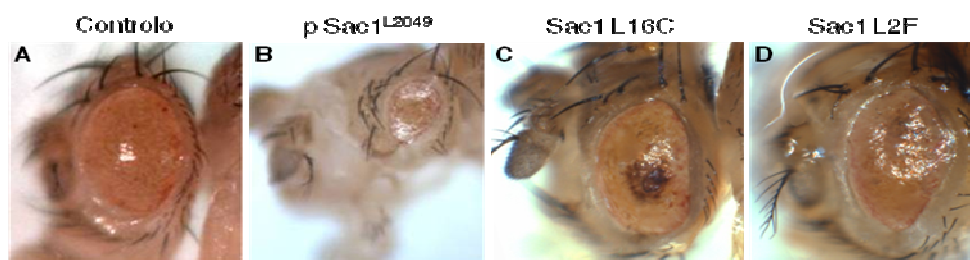
### 2.2.6. Análise da expressão de *ninaA* por RT-PCR

Para analisar o efeito da activação da via IRE1/Xbp1 nos níveis de expressão de *ninaA* no olho realizou-se uma reacção de RT-PCR. Utilizando o *High Pure RNA Tissue Kit* (Roche), extraiu-se RNA total dos discos imaginiais da antena e olho de larvas no 3º estágio de desenvolvimento sobre-expressando Xbp1<sub>spliced</sub> (Genótipo: *GMRGal4* ; *UASXbp1<sub>spliced</sub>/TM6B*) e do respectivo controlo (Genótipo: *GMRGal4*). De modo a obter uma quantificação linear, os produtos de amplificação resultantes do PCR foram comparados para os diferentes génotipos na fase exponencial da reacção de amplificação (22 ciclos para Rp49 e 26 ciclos para *ninaA*) Procedeu-se à síntese do cDNA total, usando o *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) e hexâmeros de oligonucleótidos, num volume total de reacção de 20 µL contendo RNA total à concentração de 20 ng/µL (400 ng). De seguida, procedeu-se a uma reacção de PCR usando primers específicos para *ninaA* e para o controlo interno Rp49 (sequências na Tabela 2 do **Anexo**). Para cada reacção de PCR utilizou-se 20 ng de cDNA total num volume final de 50 µL. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados num gel de agarose 1% (Figura 13). Como controlo negativo foram utilizados indivíduos sem sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub>, expressando apenas Gal4, sob o controlo do *driver* GMR (Genótipo: *w* ; *GMRGal4* ; *Sb/TM6B*).

## 2.3. Resultados e Discussão

### 2.3.1. *sac1* constitui um possível *enhancer* da neurodegeneração causada pela sobre-activação da via IRE1/Xbp1

A capacidade de *sac1* para modelar o processo de neurodegeneração causado pela sobre-activação da via IRE1/Xbp1 foi testada através de cruzamentos genéticos envolvendo indivíduos com expressão de formas mutadas de Sac1 (pSac1<sup>L2049</sup>, Sac1<sup>L16C</sup>, Sac1<sup>L2F</sup>) e indivíduos exibindo o fenótipo “*glossy*” causado pela sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> nas células do olho. A sobre-expressão de Xbp1 na sua forma activa (*spliced*) simula uma situação de indução de apoptose causada pela ocorrência de *stress* severo do RE no olho e consequente activação continuada da via IRE1/Xbp1. Após os cruzamentos, foram obtidos resultados algo contraditórios, uma vez que, a forma mutada pSac1<sup>L2049</sup> causou um enorme agravamento do fenótipo “*glossy*”, aumentando a neurodegeneração da retina e diminuindo significativamente o tamanho do olho (Figura 10B), enquanto que as formas mutadas Sac1<sup>L16C</sup> e Sac1<sup>L2F</sup> não provocaram um efeito significativo no fenótipo “*glossy*” (Figura 10C e D).



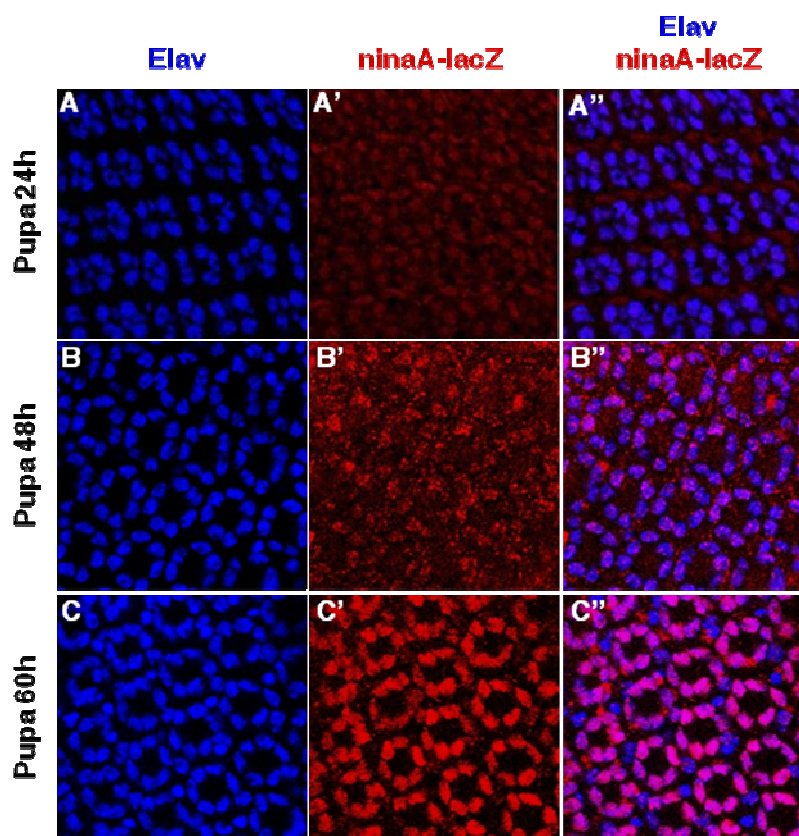
**Figura 10.** Efeito de mutações em *sac1* na neurodegeneração do olho causada pela sobreexpressão de Xbp1<sub>spliced</sub>. **A)** Olho adulto exibindo o fenótipo “*glossy*”. **B)** A inserção do *p-element* L2049 no gene de Sac1 causa um agravamento (*enhancement*) do fenótipo, com aumento da degeneração e diminuição significativa do tamanho do olho. **C), D)** Não se verificou nenhum efeito significativo das mutações pontuais L16C e L2F sobre o fenótipo.

Estes resultados poderão ser explicados pelo facto das mutações L16C e L2F serem bastante severas, o que poderá ter causado a morte precoce das células homozigóticas para estas mutações, permitindo a proliferação das células heterozigóticas, mantendo desta forma o tamanho do olho. Outra explicação poderá ter a ver com o surgimento de algum problema com a integridade das regiões FRT, impedindo a formação de mosaicos. Desta forma, são necessárias mais experiências para esclarecer o papel de *sac1* na regulação da via IRE1/Xbp1.



### 2.3.2. A activação da expressão de *ninaA* ocorre a 55% de Pupa

Para determinar o período do desenvolvimento de *Drosophila* no qual se inicia a expressão de *ninaA* utilizaram-se indivíduos com expressão do gene da beta-galactosidase, *lacZ*, sob controlo do promotor de *ninaA*. Desta forma, *lacZ* funcionou como repórter da expressão de *ninaA*. A detecção da expressão de *lacZ* foi efectuada por imunohistoquímica em secções transversais e longitudinais de retinas de pupas com diferentes idades (Figuras 11 e 12).



**Figura 11. Expressão temporal de *ninaA* em olhos de pupa com diferentes idades.** A) Em pupas com 24h não ocorre expressão de *ninaA*. B) Em pupas com 48h verifica-se o início da expressão de *ninaA* em algumas células fotoreceptoras. C) Em pupas com 60h já se verifica um elevado nível de expressão de *ninaA* em vários fotoreceptores. Os fotoreceptores estão marcados com Elav, a azul, e a expressão do gene repórter *lacZ* está marcada a vermelho.



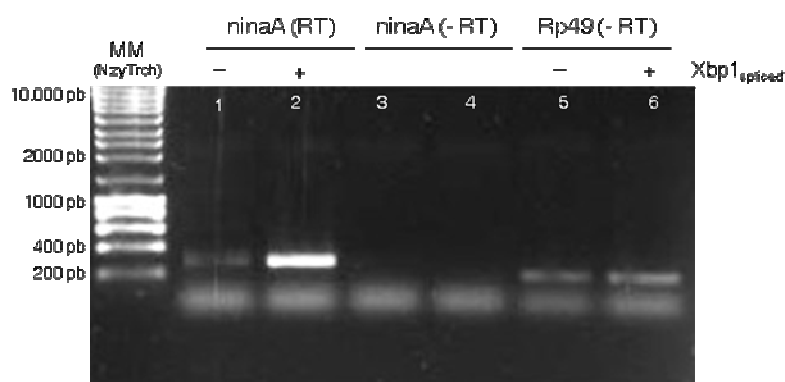
**Figura 12. Expressão de *ninaA* em olhos de pupa de 72h.** Às 72h de pupa o nível de expressão de *ninaA* é bastante elevado. **A)** Os fotoreceptores estão marcados com Elav, em azul. **B)** A expressão do gene repórter lacZ está marcada em vermelho. **C)** “merge”.

Pela análise destas secções, determinou-se que a activação da expressão de *ninaA* ocorre entre as 48 e 60h de pupas, a 25°C. Uma vez que, a 25°C, o estágio de pupa dura 100h, cada hora corresponde a 1 valor percentual do desenvolvimento de pupa. Deste modo, a activação da expressão de *ninaA* ocorre quando a pupa atinge um grau de desenvolvimento entre os 48% e 60%. Como já foi referido, NinaA é uma chaperone necessária à correcta biogénese da rodopsina 1. Dado que, a síntese de rodopsina 1 inicia-se a 78% de pupa<sup>66</sup>, é razoável pensar-se que a activação da expressão de *ninaA* deveria iniciar-se algum tempo antes. Além disso, estudos anteriores demonstraram que a maturação da rodopsina 1 é quantitativamente dependente dos níveis de NinaA, sendo que uma redução dos níveis de NinaA em 50% é suficiente para causar a acumulação de rodopsina 1 no RE<sup>57</sup>. Desta forma, os nossos resultados são, de algum modo, consistentes com esta informação. De facto, determinámos experimentalmente que a expressão de *ninaA* inicia-se entre os 48% e 60% pupa. Ou seja, a 25°C, NinaA começará a ser expressa com uma antecedência de cerca de 23h em relação à síntese de rodopsina 1. Como interpretação deste resultado, sugerimos que a expressão precoce de *ninaA* constitui uma forma de assegurar que, no momento em que se inicia a síntese de rodopsina 1 (78% de pupa) nos fotoreceptores, a quantidade necessária de NinaA já estará disponível.

### 2.3.3. A transcrição de *ninaA* é regulada pela via IRE1/Xbp1

Com a finalidade de avaliar o envolvimento da via IRE1/Xbp1 na regulação dos níveis de expressão de *ninaA* no olho de *Drosophila*, realizaram-se duas experiências independentes. Num ensaio, foram analisados, por RT-PCR, os níveis de transcrição deste gene nos discos imaginários de larvas do 3º estágio de desenvolvimento, em condições de sobre-activação da via IRE1/Xbp1, através da sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub>. Por análise dos produtos de PCR do cDNA de NinaA em gel de agarose (Figura 13), verificou-se que em olhos com sobre-

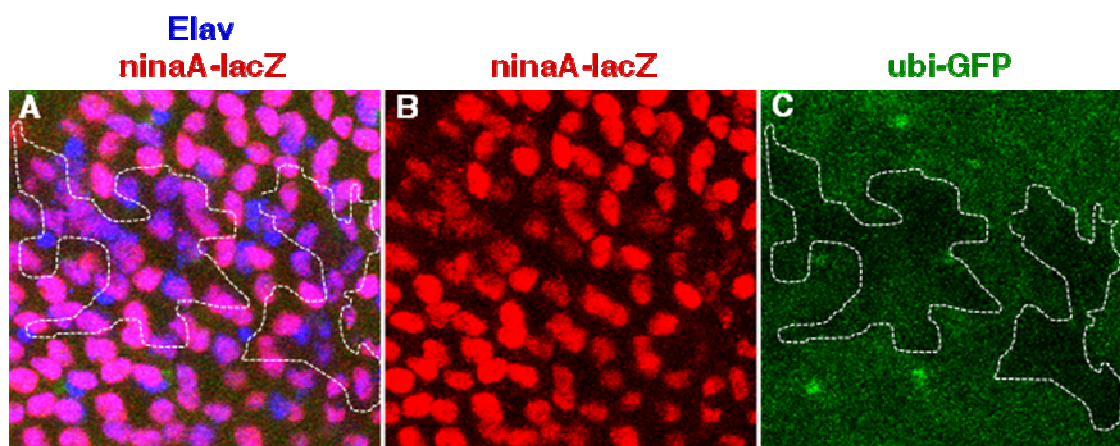
expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> ocorreu um aumento da banda de 364 pb correspondente ao cDNA de *ninaA* (poço 2), comparativamente aos níveis de transcrição verificados em indivíduos sem sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> (poço 1).



**Figura 13. Regulação transcricional de *ninaA* por Xbp1<sub>spliced</sub>.** Análise dos produtos de PCR em gel de agarose 1% para *ninaA*. A sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> provocou um aumento significativo dos níveis de transcrição de *ninaA* (banda de 364 pb no **poço 2**) comparativamente aos níveis verificados em indivíduos sem sobre-expressão de Xbp1<sub>spliced</sub> (banda de 364 pb **poço 1**). Os **poços 3 e 4** correspondem a um controlo negativo de contaminação de DNA genómico da reacção de RT-PCR. Os **poços 5 e 6** correspondem ao controlo interno para o gene da *Ribossomal protein 49* (Rp49).

Desta forma, demonstrou-se que a via IRE1/Xbp1 está envolvida na regulação da transcrição de *ninaA* e que Xbp1<sub>spliced</sub> é um regulador transcricional positivo de *ninaA*, ou seja, a activação da via IRE1/Xbp1 induz um aumento dos níveis de transcrição da chaperone NinaA. Nesta experiência, realizaram-se dois controlos da reacção de RT-PCR: um controlo negativo da reacção de RT-PCR (poços 3 e 4) para garantir a não existência de contaminação com DNA genómico e um controlo interno para o gene da *Ribossomal protein 49* - Rp49 (poços 5 e 6) para garantir que se utilizou a mesma quantidade de RNA total em todos os ensaios.

A outra experiência consistiu em testar o efeito da inactivação total da via IRE1/Xbp1, através de clones mutantes para IRE1, nos níveis de transcrição de *ninaA* no olho de pupas de 55% (55 h, a 25°C). Após a dissecação e imunohistoquímica dos olhos destas pupas, verificou-se que nas células homozigóticas para a forma mutante IRE1<sup>R02170</sup>, ocorre uma diminuição significativa dos níveis de transcrição de *ninaA* (Figura 14).



**Figura 14. Expressão de *ninaA* em clones de *IRE1<sup>f02170</sup>* em olhos de pupa de 55 horas.** A) Nos clones de *IRE1<sup>f02170</sup>* (assinalados a tracejado) não ocorre expressão de *ninaA*. Os fotoreceptores estão marcados com *Elav*, a azul. B) Expressão de *ninaA* indicada pela expressão do gene repórter *lacZ*, marcado a vermelho. C) Clones de *IRE1<sup>f02170</sup>* marcados pela ausência verde resultante da expressão de GFP (assinalado a tracejado).

Este resultado, constitui mais uma prova de que a via IRE1/Xbp1 tem, de facto, um papel no controlo da expressão de *ninaA* e de que *ninaA* é um gene candidato a modulador do processo de neurodegeneração causado pela sobre-activação daquela via. De qualquer forma, mais estudos são necessários para identificar o mecanismo desta regulação, bem como se ocorre de uma forma directa ou indirecta.

### 3. Modelos das doenças de Parkinson e de Huntington em *Drosophila*

#### 3.1. Introdução

As doenças de Parkinson (DP) e de Huntington (DP) são duas doenças neurodegenerativas distintas que se incluem no grupo das "doenças do movimento", por afectarem gravemente a condição motora dos pacientes.

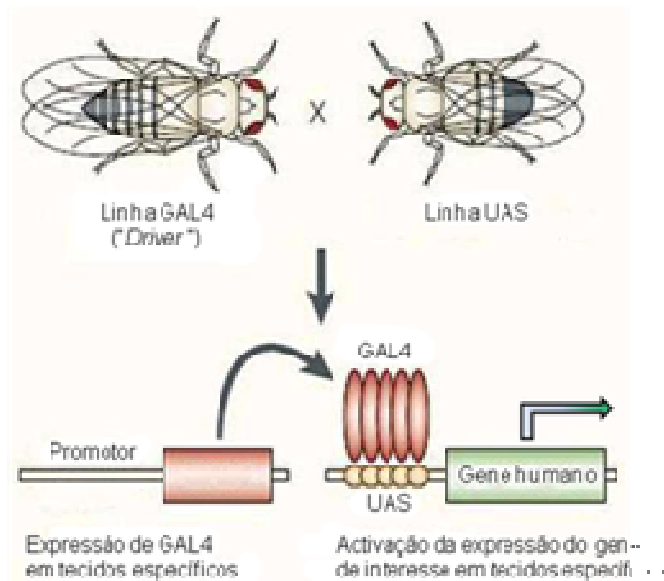
A doença de Parkinson (DP) constitui a segunda doença neurodegenerativa com maior incidência (a primeira é a doença de Alzheimer), afectando cerca de 4 milhões de pessoas em todo o mundo<sup>67</sup>. Os pacientes com DP apresentam sintomas como bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntários), tremor de repouso e rigidez muscular. As duas características principais desta patologia são a formação de agregados citoplasmáticos de proteínas *misfolded*, denominados *Lewy bodies* (LB), e a morte progressiva dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra*. O principal constituinte dos LB é a  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn), a mais importante proteína envolvida na patogénese da DP. Estudos genéticos de pacientes com formas hereditárias autossómicas dominantes da DP demonstraram o envolvimento da  $\alpha$ -Syn nesta doença, tendo sido descritas várias mutações patológicas independentes: A30P, a substituição de uma alanina por uma prolina na posição 30 da sequência polipeptídica, E46K, a substituição de uma glutamina por uma lisina na posição 46, e A53T, a substituição de uma alanina por uma treonina na posição 53. Além destas mutações pontuais, demonstrou-se que a triplicação genómica do gene da  $\alpha$ -Syn também está associado com formas familiares da DP, sendo a sobreexpressão de  $\alpha$ -Syn suficiente para causar doença<sup>68-70</sup>.

A doença de Huntington (DH) é uma doença neurodegenerativa hereditária progressiva que afecta principalmente populações europeias. Os pacientes apresentam sintomas relacionados com uma diminuição de capacidades a nível cognitivo, emocional e motor<sup>71-72</sup>. É uma doença fatal, ocorrendo geralmente morte 10 a 15 anos após o início dos sintomas. A DH caracteriza-se pela morte de neurónios de uma forma extremamente específica, em que a região mais sensível é o *striatum*, afectando o *caudate nucleus* e o *putamen*. O desenvolvimento da DH tem sido associado com a expansão do trinucleótido

CAG presente no gene da Huntingtina (Htt), que resulta na produção de uma forma mutada de Htt contendo uma cauda expandida de glutaminas (poliQ). A doença apenas ocorre quando o número de glutaminas nesta cauda é superior a 36-39. Quanto maior este número, maior o grau de severidade e menor a idade de início da doença. Pensa-se que a Htt mutada adquira novas propriedades e se torne tóxica, sendo a causa da disfunção celular, neurodegeneração e sintomas associados à DH<sup>73</sup>.

Os modelos das DP e DH desenvolvidos neste trabalho baseiam-se na expressão de versões *wild-type* e mutadas de  $\alpha$ -Syn e Htt. Foram também desenvolvidas versões destas proteínas fundidas com GFP. A utilização destas proteínas de fusão, marcadas por GFP, constitui uma vantagem em relação aos modelos previamente desenvolvidos, uma vez que possibilitará a análise directa, *in vivo* e *in situ*, da acumulação das proteínas *misfolded* e da formação dos agregados.

Para expressar as proteínas de interesse em *Drosophila* utiliza-se o sistema *GAL4/UAS*<sup>74</sup>. Resumidamente, *GAL4/UAS*, consiste num sistema binário, constituído por duas componentes inseridas em diferentes linhas parentais: as linhas GAL4, codificando a proteína GAL4, que é um activador da transcrição de levedura, e as linhas UAS, contendo o gene de interesse clonado a jusante da *Upstream Activation Sequence* (UAS) (Figura 15).



**Figura 15. Sistema GAL4/UAS para expressão de proteínas em *Drosophila*.** O sistema GAL4/UAS permite a expressão ectópica de um gene humano (ou outro) num tecido ou tipo de célula específicos. Neste sistema, são desenvolvidas duas linhas transgênicas: linha UAS e linha GAL4. A primeira contém o gene de interesse clonado a jusante da sequência UAS (*Upstream Activating Sequence*) onde o activador de transcrição de levedura GAL4 se liga. A segunda expressa GAL4 sob controlo de um promotor específico. O gene sob controlo de UAS apenas é activado quando estas moscas são cruzadas com uma linha GAL4, também conhecidas por “*driver*”. Uma grande variedade destes “*drivers*” está disponível em centros públicos de *stocks* de *Drosophila*. Adaptado de <sup>44</sup>.

A sequência UAS consiste numa pequena secção da região promotora onde GAL4 se liga especificamente e activa a transcrição do gene clonado a jusante de UAS. A expressão de GAL4 está sob controlo de um promotor específico de um determinado tecido de interesse. Quando se cruzam as linhas GAL4 com as linhas UAS, GAL4 dirige a expressão do gene de interesse (neste caso, genes associados a doenças neurodegenerativas humanas) de uma forma “controlada no tempo e no espaço” dependendo das características do promotor usado. Por esta razão, as linhas GAL4 também são vulgarmente designadas “*drivers*”.

Apesar de grandes esforços, o conhecimento dos mecanismos associados ao desenvolvimento das DP e DH continua a ser extremamente reduzido. Além disso, os fármacos actualmente disponíveis apenas aliviam os sintomas, não contribuindo para uma cura. Desta forma, é fundamental continuar a desenvolver novos modelos animais destas doenças que permitam desvendar os mecanismos moleculares que estão na origem destas doenças, bem como testar novos compostos candidatos a fármacos.

## 3.2. Materiais e Métodos

### 3.2.1. Clonagem dos cDNAs de interesse em pUAST

A partir de vectores de levedura contendo  $\alpha$ Syn:GFP e Htt:GFP, cedidos pelo Doutor Tiago Outeiro (IMM, Lisboa), procedemos à subclonagem dos *inserts* para pUAST (Figura 1B do **Anexo**), um vector de expressão de *Drosophila*. Para facilitar o processo de subclonagem, utilizou-se o vector pJET (Figura 1A do **Anexo**) como vector intermediário. A metodologia utilizada consistiu na aplicação de técnicas convencionais de biologia molecular, previamente descritas<sup>75</sup>.

#### i. Amplificação dos *inserts* por PCR

Os cDNAs contidos nos vectores de levedura foram amplificados por PCR (*polymerase chain reaction*). Para esta reacção de PCR foram desenhados primers contendo oligonucleótidos adicionais na sua porção terminal 5', criando novos locais de restrição para as enzimas *Bgl* II e *Acc* 65 I, convenientes à posterior subclonagem para pUAST. As sequências dos *primers* utilizados na reacção de PCR estão disponíveis na Tabela 3 do **Anexo**.

#### ii. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da reacção de PCR foram purificados da mistura de reacção utilizando o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

#### iii. Reacções de restrição

Os *inserts* amplificados em **i.** e os plasmídios pUAST de destino foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Acc* 65 I (New England BioLabs). Os volumes das reacções de restrição foram incubados 16 a 18 h, a 37°C.

#### iv. Electroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos das reacções de digestão obtidos em **iii.** foram separados num gel 0,8% de agarose *low melting point* da SeaKem LE (Lonza). O tampão de preparação do gel e de corrida utilizado foi o TAE (Tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M; Lonza). Para posterior visualização e extracção das bandas, incorporou-se SYBR Green 1X (Invitrogen) no gel.



Para estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA utilizou-se o marcador molecular Quick-Load 1kb (BioLabs).

#### **v. Extração de DNA de gel de agarose**

As bandas de DNA de interesse foram extraídas e purificadas de géis 0,8% de agarose *low melting point* da SeaKem LE (Lonza) usando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

#### **vi. Reacções de ligação**

Após extração e purificação dos *inserts* e do vector pUAST digeridos, procedeu-se à sua ligação para obtenção das moléculas recombinantes finais (cDNAs de interesse clonados em pUAST). Nas reacções de ligação utilizou-se *T4 DNA ligase* (New England Biolabs) e incubou-se 16 a 18 h, a 18°C. A razão molar *insert* / vector utilizada nunca foi inferior a 3:1.

#### **vii. Sequenciação de DNA**

Para confirmar a clonagem e integridade dos *inserts* procedeu-se à sequenciação dos plasmídeos (Stabvida).

### **3.2.2. Produção de linhas transgénicas UAS**

Após a clonagem dos vários cDNAs em pUAST, procedeu-se à produção de linhas transgénicas por injeção destes plasmídeos em embriões de *Drosophila* (BestGene).

As linhas UAS produzidas para o modelo da DP foram UAS- $\alpha$ Syn (*wild-type*) UAS- $\alpha$ Syn:GFP (*wild-type fusão*) e UAS- $\alpha$ SynA53T:GFP (mutada), para o modelo da DH foram UAS-Htt25Q:GFP (*wild-type*) e UAS-Htt103Q:GFP (mutada).

### **3.2.3. Mapeamento das inserções nas linhas UAS**

O procedimento de transgénese por injeção de embriões de *Drosophila* gera diferentes linhas genéticas contendo os genes de interesse inseridos ao acaso no genoma. Assim, após a obtenção das linhas UAS, foi necessário determinar o local do genoma onde ocorreram as inserções, isto é, fazer o seu mapeamento, identificando o cromossoma (X, II ou III) que contem o transgene. O mapeamento das inserções foi

feita através de cruzamentos genéticos que, por análise da segregação de alelos (ou cromossomas), permitem identificar o cromossoma contendo o transgene. O plasmídeo pUAST, contendo o transgene de interesse utilizado nas injecções, possui como marcador de selecção genética o gene *mini-White* (ver Figura 1B do **Anexo**), responsável pela produção do pigmento vermelho dos olhos. Desta forma, o cruzamento necessário para fazer o mapeamento consiste em cruzar as linhas transgénicas (de olhos vermelhos) com uma linha mutante para este gene, de olhos brancos (Genótipo: *yw*) e “seguir a segregação” deste marcador na descendência deste cruzamento (Ver **Anexo** para descrição detalhada dos cruzamentos efectuados).

#### **3.2.4. Expressão das proteínas associadas às DP e DH em células S2**

As células utilizadas neste estudo foram as Schneider 2 (S2), adquiridas ao *Drosophila Genomics Resource Center* (DGRC). A linha celular S2 (ATCC:CRL-1963) é derivada de uma cultura primária de embriões de *Drosophila* no último estágio (20-24h)<sup>76</sup>. Neste trabalho, utilizámos células S2 para expressar as proteínas de fusão  $\alpha$ Syn-GFP e Htt103Q-GFP e analisar a eventual formação de agregados proteicos.

##### **i. Manutenção de células S2 em cultura**

As culturas de células S2 foram mantidas a 25°C em frascos de cultura de 75 cm<sup>3</sup> (volume máximo de 15 mL) em meio Schneider de *Drosophila* (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), previamente inactivado por calor (30 min a 56°C) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomycin (Gibco). De forma a manter as células em fase exponencial de crescimento fizeram-se diluições de 1:5 em meio fresco a cada 4 dias, mantendo uma confluência máxima de 80%.

##### **ii. Transfecção de células S2**

A transfecção de células S2 foi efectuada em placas de cultura de 6 poços (2 mL por poço) a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL (confluência 50%). As células foram mantidas durante 16h a 25°C para permitir a sua aderência e prosseguir à co-transfecção transiente dos plasmídios em estudo: pUAST  $\alpha$ Syn-GFP; pUAST Htt103Q-GFP ; pActin-Gal4 (plasmídeo que codifica o activador de transcrição Gal4). Para cada transfecção utilizou-se 1 µg de cada um dos plasmídios usando como

reagente de transfecção Cellfectin (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas durante 6h a 25°C com a mistura de transfecção. De seguida, substituiu-se esta mistura por meio Schneider suplementado e incubaram-se as células transfectadas durante 24h a 25°C para expressão das proteínas.

### iii. Análise de fluorescência por microscopia confocal

Após a expressão proteica, procedeu-se à análise da formação de agregados nas células transfectadas. A presença de agregados proteicos foi detectada directamente por fluorescência do GFP das proteínas de fusão. A preparação das amostras para microscopia foi feita seguindo as indicações de Rogers & Rogers<sup>77</sup>. Utilizaram-se lamelas de 22 mm<sup>2</sup> previamente lavadas com etanol 100% e tratadas com concanavilin A (Sigma) à concentração de 0,5 mg/mL, de modo a permitir a aderência das células. As células foram transferidas para as lamelas e fixadas numa solução de 10% (v/v) de formaldeído diluído em PBS durante 10 min à temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens, de 10 min cada, à temperatura ambiente, com PBST. Os núcleos das células foram marcados com o corante nuclear TO-PRO 3 (Molecular Probes), seguindo as instruções do fabricante. Procedeu-se à montagem das amostras em lâminas de vidro para microscopia, usando como meio de montagem uma solução à base de glicerol (90% glicerol, 10% PBS, 3% (m/v) *n-propyl gallate*). Para a observação das amostras utilizou-se um microscópio confocal invertido da Zeiss, modelo LSM 510 Meta. A aquisição de imagens foi efectuada com o software Zeiss SP 2 versão 4.0.

### 3.2.5. Expressão das proteínas associadas às DP e DH no olho de *Drosophila*

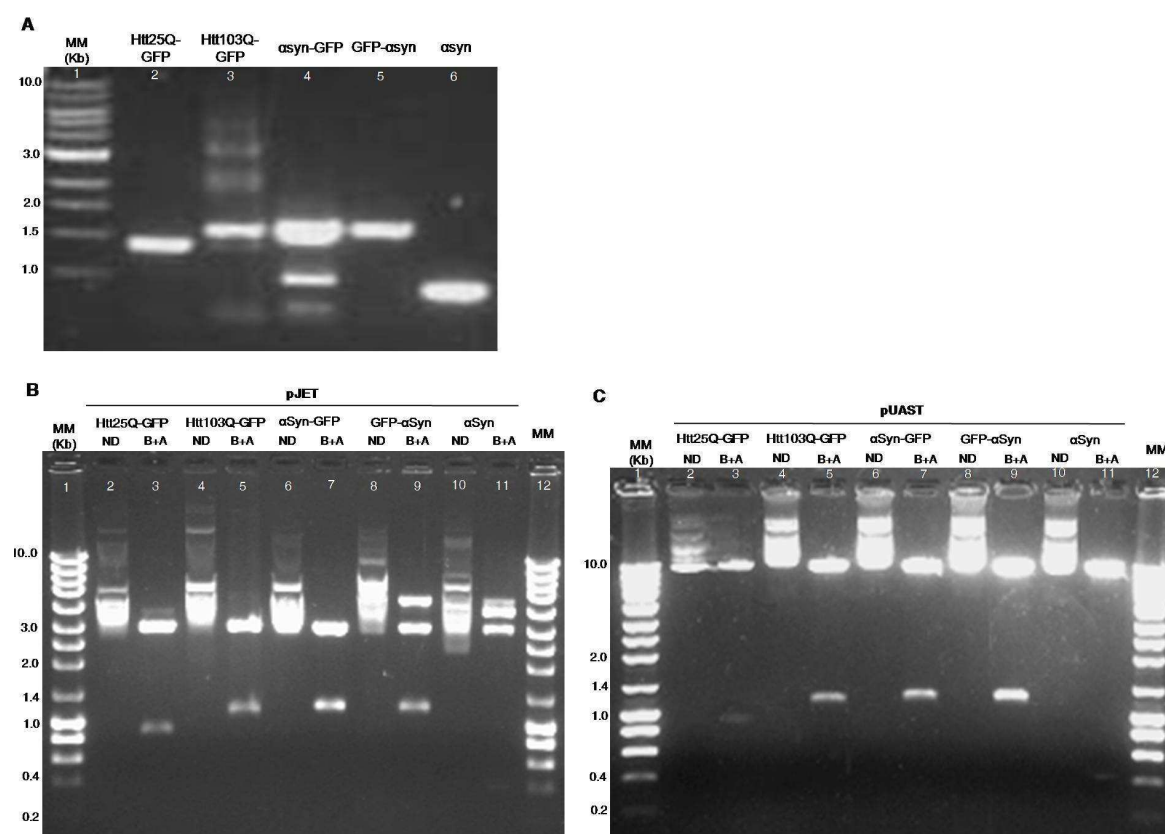
Após obtenção das linhas UAS procedeu-se à expressão dirigida das proteínas associadas às DP e DH no olho de *Drosophila*. Para isso, procedeu-se ao cruzamento genético das linhas UAS com o “*driver*” GMR-Gal4 no qual a expressão de Gal4 está sob controlo do promotor do gene *glass*, GMR (*glass multimer reporter*), expresso especificamente nas células do olho de *Drosophila* (ver cruzamento no **Anexo**). Na descendência deste cruzamento foram analisados os efeitos de neurodegeneração da retina nos indivíduos adultos nos quais ocorreu expressão das proteínas. Na análise dos olhos utilizou-se um estereomicroscópio Leica Z16 APOA e as fotografias foram adquiridas com uma máquina fotográfica Leica DFC420 C e recorrendo ao software LAS versão 3.4.0, da Leica.

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Do processo de transgênesse resultaram várias linhas UAS independentes

O desenvolvimento de modelos das DP e DH em *Drosophila* implica o estabelecimento de dois tipos de linhas: as linhas UAS e as linhas GAL4. Deste modo, procedeu-se à geração de linhas UAS, isto é, linhas transgênicas contendo no seu genoma os cDNAs de interesse clonados a juzante da sequência UAS.

O primeiro passo para estabelecer estas linhas consistiu na subclonagem por PCR dos vários cDNAs de interesse, originalmente inseridos em vectores de levedura, para pUAST, um vector de *Drosophila* (Figura 16).

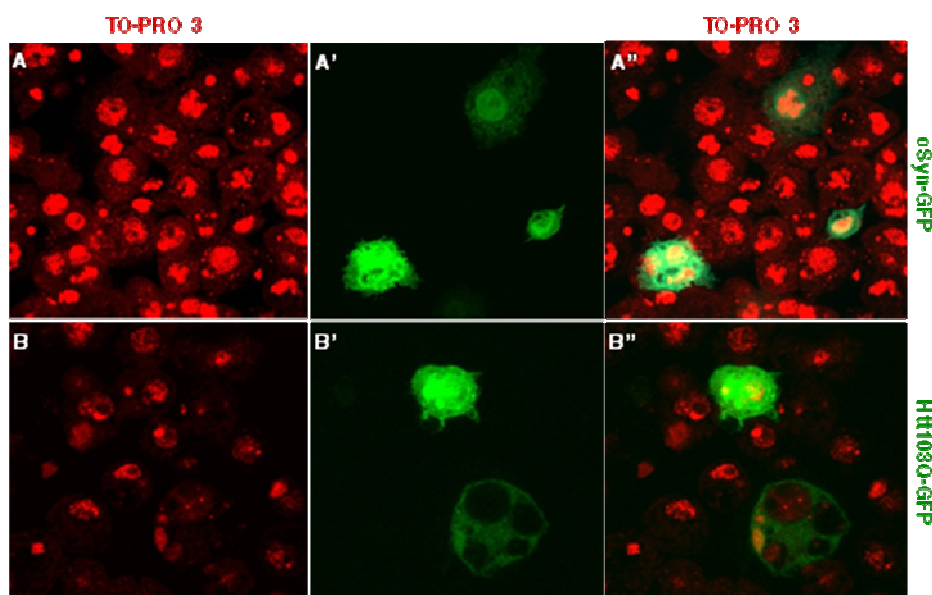


**Figura 16. Clonagem dos cDNAs de interesse em pUAST.** A) Gel de agarose 1% para confirmação da eficiência das reacções de amplificação dos *inserts* por PCR (tamanho dos *inserts*: Htt25Q-GFP, 864 pb ; Htt103Q-GFP, 1098 pb ; αSyn-GFP e GFP-αSyn, 1146 pb ; αSyn, 422 pb). B) Gel de agarose 1% para confirmação da clonagem dos *inserts* no vector intermediário pJET por análise de restrição (tamanho de pJET: 2974 pb). C) Gel de agarose 1% para confirmação da clonagem dos *inserts* no vector de destino pUAST (tamanho de pUAST: 8896 pb). (MM = marcador molecular; ND = não digerido; B+A = digestão dupla com *Bgl* II e *Acc65I* ).

Analizando o gel de agarose para confirmação da eficiência das reacções de PCR (Figura 16 A) verificou-se que o tamanho das bandas dos produtos de amplificação obtidos correspondiam ao tamanho esperado dos cDNAs de interesse. A ligação dos cDNAs de interesse a pJET e, posteriormente, a pUAST, foi confirmada por análises de restrição em géis de agarose (Figura 16 B e C). Analisando estes géis, verificou-se que os tamanhos dos produtos de digestão, obtidos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Acc*65I, correspondiam ao esperado, confirmando a eficiência das reacções de ligação. Após a clonagem das diferentes construções em pUAST, procedeu-se ao processo de transgénese, por injeção de embriões de *Drosophila*. As construções injectadas durante este trabalho foram: pUAST Htt25Q-GFP, pUAST Htt103Q-GFP e pUAST  $\alpha$ Syn-GFP. Para cada uma destas construções foram obtidos cerca de 10 indivíduos adultos transformantes. De seguida, procedeu-se aos cruzamentos genéticos necessários para estabelecer estas linhas transgénicas e para mapear os locais de inserção dos cDNAs no genoma. No final deste procedimento, foi possível estabelecer várias linhas UAS independentes de cada construção: 9 linhas UAS Htt25Q-GFP, 10 linhas UAS Htt103Q-GFP e 10 linhas UAS  $\alpha$ Syn-GFP (ver Tabela 4 do **Anexo**).

### **3.3.2. A expressão das proteínas associadas às DP e DH em células S2 de *Drosophila* induz a formação de agregados**

Um dos aspectos comuns à maioria das doenças neurodegenerativas humanas consiste na acumulação de proteínas associadas a estas doenças em agregados. Para testarmos o efeito da sobre-expressão “*in vitro*” das nossas versões de proteínas associadas às DP e DH, procedemos à transfecção das construções genéticas em células S2 de *Drosophila*. As construções transfectadas foram: pUAST  $\alpha$ Syn-GFP e pUAST Htt103Q-GFP. Após a expressão das respectivas proteínas, analisámos as células por microscopia confocal e verificámos a presença de agregados proteicos (Figura 17). Estes resultados constituem uma indicação de que, quer as versões das proteínas de fusão criadas, quer o sistema biológico utilizado, *Drosophila*, são adequados para a modelação das DP e DH.

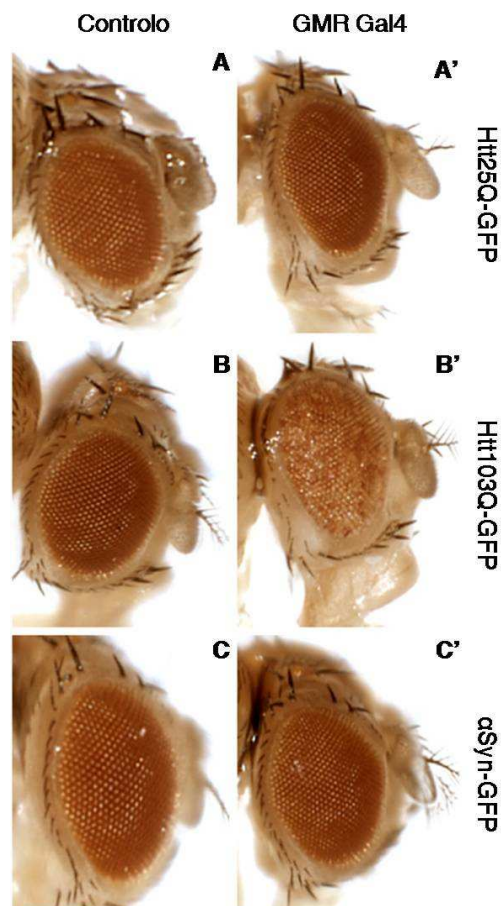


**Figura 17. A expressão de proteínas associadas às doenças de Huntington e de Parkinson em células S2 de *Drosophila* induz a formação de agregados proteicos.** Os núcleos das células estão marcados com TO-PRO3 (Invitrogen), a vermelho, os agregados estão marcados pelo GFP, a verde. **A, A' e A''**) A expressão da versão de fusão da  $\alpha$ -sinucleína com GFP induziu a formação de agregados proteicos. **B, B' e B''**) A expressão da versão de fusão da huntingtina com 103 glutaminas e GFP induziu a formação de agregados proteicos.

### 3.3.3. A expressão da versão mutada de Huntingtina no olho de *Drosophila* induz a neurodegeneração da retina

O sistema GAL4/UAS permite, tal como anteriormente explicado, dirigir a expressão de proteínas de interesse para tecidos específicos. Nesta fase do trabalho, pretendíamos expressar as proteínas associadas às DP e DH no olho de *Drosophila*, analisando os efeitos de neurodegeneração sobre a retina. Desta forma, procedemos ao cruzamento genético das linhas UAS, previamente estabelecidas, com o “driver” GMR-Gal4, que induz a expressão das proteínas de interesse no olho de *Drosophila*, desde o 3º estágio larvar.

Assim, deste cruzamento resultaram indivíduos nos quais ocorreu, desde o 3º estágio larvar, a expressão das proteínas de interesse nas células do olho (Figura 18).



**Figura 18. Expressão de proteínas associadas às doenças de Huntington e de Parkinson na retina do olho de *Drosophila* (driver GMR). A e A')** A expressão de huntingtina contendo uma cauda de 25 glutaminas e fundida a GFP (Htt25Q-GFP) não induziu qualquer degeneração da retina. **B e B')** A expressão de huntingtina contendo uma cauda de 103 glutaminas e fundida a GFP (Htt103Q-GFP) induziu degeneração da retina. **C e C')** A expressão de  $\alpha$ -sinucleína fundida a GFP ( $\alpha$ Syn-GFP) não induziu qualquer degeneração da retina.

Verificámos que a expressão da versão de proteína associada à DH, huntingtina com uma cauda de 103 glutaminas (Htt103Q-GFP), induziu a neurodegeneração da retina (Figura 18B). Este fenótipo de neurodegeneração é claramente detectável pela desorganização dos omatídeos e pelo aparecimento de regiões brilhantes (“glossy”) no olho dos adultos. A expressão da versão *wild-type* da huntingtina contendo uma cauda de 25 glutaminas (Htt25Q-GFP) não provocou qualquer degeneração. Estes resultados são consistentes com o facto de, em humanos, a huntingtina apenas ser tóxica e capaz de induzir a DH quando o número de glutaminas é superior a 36-39 e constituem uma primeira validação *in vivo* do novo modelo de *Drosophila* para a Doença de Huntington.

A sobre-expressão da proteína associada à DP ( $\alpha$ Syn-GFP) não induziu qualquer neurodegeneração da retina (figura 18C). Este resultado, poderá dever-se ao facto dos efeitos tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína ocorrerem mais tardiamente. Foi anteriormente demonstrado, num estudo envolvendo outro modelo de DP em *Drosophila* que a neurodegeneração da retina de indivíduos a expressar  $\alpha$ -Sinucleína no olho apenas se inicia aos 30 dias de idade<sup>78</sup>. No entanto, outro estudo envolvendo o mesmo modelo de DP do estudo anterior, demonstrou que indivíduos a expressar  $\alpha$ -sinucleína no olho, com 40 dias de idade, possuíam retinas com morfologias totalmente intactas<sup>79</sup>. Deste modo, são necessários mais estudos, envolvendo novas metodologias, tais como, *retinal plastic sections*<sup>80</sup>, para esclarecer quais os efeitos da sobre-expressão de  $\alpha$ -sinucleína no olho de *Drosophila*.





## 4. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

No âmbito desta tese de mestrado, foi possível demonstrar a interação genética existente entre os genes *sac1* e *ninaA* e a via de sinalização IRE1/Xbp1. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer se estes genes são, de facto, moduladores da neurodegeneração induzida pela sobre-activação da via IRE1/Xbp1.

Relativamente aos modelos das DP e DH, foram desenvolvidas várias linhas transgénicas UAS contendo no seu genoma os cDNAs de proteínas associadas às DP e DH. O estabelecimento destas linhas constitui, sem dúvida, a base do trabalho de investigação que pretendemos realizar no futuro. São vários os estudos que poderemos vir a desenvolver. Desde logo, utilizando diferentes “drivers” (linhas GAL4) será possível dirigir a expressão das proteínas associadas às DP e DH para diferentes tecidos do sistema nervoso e analisar os seus efeitos. Alguns destes “drivers”, já estão disponíveis no nosso laboratório, tais como, *elav*-GAL4 (expressão em todos os neurónios), *GMR*-GAL4 (células do olho) e *TH*-GAL4 (neurónios dopaminérgicos). Além disso, estão disponíveis em *Bloomington Drosophila Stock Center*, 156 “drivers” com expressão de GAL4 em tecidos específicos e sub-populações de neurónios do sistema nervoso de *Drosophila*, que também pretendemos testar. Este trabalho, além de permitir a análise *in vivo* da formação de agregados proteicos em diferentes tecidos, poderá conduzir à identificação de sub-populações de neurónios que são mais sensíveis aos efeitos tóxicos destes agregados. Utilizando o modelo biológico, por nós estabelecido, iremos testar o efeito terapêutico de solutos compatíveis, pequenas moléculas orgânicas produzidas por microrganismos hipertermófilos, cedidos pelo “Laboratório de Fisiologia Celular e NMR” chefiado pela Prof.<sup>a</sup> Helena Santos (ITQB, Oeiras). Estudos recentes, demonstraram efeitos benéficos de alguns destes solutos compatíveis (ex.: ectoína e trehalose) na prevenção da formação de agregados proteicos<sup>81-82</sup>. Além disso, será possível proceder a um *screen* genético visando a identificação de genes modeladores do processo de neurodegeneração.

Durante a realização destes estudos iremos tirar partido da imensidão de “ferramentas genéticas” existentes para *Drosophila* e utilizaremos várias técnicas, tais como, imunofluorescência com anticorpos específicos, *live imaging* com microscópio confocal, *pseudopupil assay* e *retinal plastic sections*, como anteriormente descrito<sup>55</sup>. Iremos também utilizar ensaios comportamentais, como o *climbing assay*<sup>83</sup>, que detecta anomalias nas capacidades motoras das moscas, analisando a sua resposta negativa geostática.

Estamos confiantes que os novos modelos das DP e DH em *Drosophila*, desenvolvidos neste trabalho, irão contribuir para um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no desenvolvimento destas patologias e facilitar o teste de novas drogas.

---

## 5. Bibliografia

1. Adesnik, M., Lande, M., Martin, T. & Sabatini, D.D. Retention of mRNA on the endoplasmic reticulum membranes after in vivo disassembly of polysomes by an inhibitor of initiation. *J Cell Biol* **71**, 307-313 (1976).
2. Lande, M.A., Adesnik, M., Sumida, M., Tashiro, Y. & Sabatini, D.D. Direct association of messenger RNA with microsomal membranes in human diploid fibroblasts. *J Cell Biol* **65**, 513-528 (1975).
3. Dobson, C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 3-16 (2004).
4. Haas, I.G. & Wabl, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**, 387-389 (1983).
5. Munro, S. & Pelham, H.R. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291-300 (1986).
6. Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I. & Ron, D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 575-599 (2002).
7. Schroder, M. & Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789 (2005).
8. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529 (2007).
9. Zhang, K. & Kaufman, R.J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455-462 (2008).
10. Bonifacino, J.S. & Weissman, A.M. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 19-57 (1998).
11. Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T.A. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-255 (2002).
12. Marciniak, S.J. & Ron, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews* **86**, 1133-1149 (2006).
13. Koizumi, N., *et al.* Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol* **127**, 949-962 (2001).

14. Sidrauski, C. & Walter, P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039 (1997).
15. Liu, C.Y., Schroder, M. & Kaufman, R.J. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **275**, 24881-24885 (2000).
16. Plongthongkum, N., Kullawong, N., Panyim, S. & Tirasophon, W. Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* **354**, 789-794 (2007).
17. Hollien, J. & Weissman, J.S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**, 104-107 (2006).
18. Wang, X.Z., *et al.* Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* **17**, 5708-5717 (1998).
19. Tirasophon, W., Welihinda, A.A. & Kaufman, R.J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* **12**, 1812-1824 (1998).
20. Bertolotti, A., *et al.* Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 $\beta$ -deficient mice. *J Clin Invest* **107**, 585-593 (2001).
21. Urano, F., Bertolotti, A. & Ron, D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3697-3702 (2000).
22. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332 (2000).
23. Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A. & Kohno, K. Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 445-450 (2000).
24. Oikawa, D., Kimata, Y. & Kohno, K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *J Cell Sci* **120**, 1681-1688 (2007).

- 
25. Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M. & Walter, P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773-18784 (2005).
  26. Shamu, C.E. & Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* **15**, 3028-3039 (1996).
  27. Welihinda, A.A. & Kaufman, R.J. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* **271**, 18181-18187 (1996).
  28. Liu, C.Y., Wong, H.N., Schauerte, J.A. & Kaufman, R.J. The protein kinase/endoribonuclease IRE1 $\alpha$  that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J Biol Chem* **277**, 18346-18356 (2002).
  29. Papa, F.R., Zhang, C., Shokat, K. & Walter, P. Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science* **302**, 1533-1537 (2003).
  30. Cox, J.S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404 (1996).
  31. Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. & Yura, T. Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* **1**, 803-817 (1996).
  32. Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S. & Fukuda, T. *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res* **24**, 4222-4226 (1996).
  33. Shen, X., *et al.* Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* **107**, 893-903 (2001).
  34. Yoshida, H., *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 $\alpha$  and 6 $\beta$  that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **21**, 1239-1248 (2001).
  35. Calton, M., *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96 (2002).

- 
36. Lee, A.H., Iwakoshi, N.N. & Glimcher, L.H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**, 7448-7459 (2003).
  37. Shaffer, A.L., *et al.* XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21**, 81-93 (2004).
  38. Oda, Y., *et al.* Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **172**, 383-393 (2006).
  39. Urano, F., *et al.* Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y)* **287**, 664-666 (2000).
  40. Lu, B. & Vogel, H. Drosophila models of neurodegenerative diseases. *Annual review of pathology* **4**, 315-342 (2009).
  41. Michno, K., van de Hoef, D., Wu, H. & Boulianne, G.L. Demented flies? Using Drosophila to model human neurodegenerative diseases. *Clinical genetics* **67**, 468-475 (2005).
  42. Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res* **11**, 1114-1125 (2001).
  43. Koo, E.H., Lansbury, P.T., Jr. & Kelly, J.W. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9989-9990 (1999).
  44. Muqit, M.M. & Feany, M.B. Modelling neurodegenerative diseases in Drosophila: a fruitful approach? *Nat Rev Neurosci* **3**, 237-243 (2002).
  45. Selkoe, D.J. Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**, 900-904 (2003).
  46. Cooper, A.A., *et al.* Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324-328 (2006).
  47. Delaunay, A., *et al.* The ER-bound RING finger protein 5 (RNF5/RMA1) causes degenerative myopathy in transgenic mice and is deregulated in inclusion body myositis. *PLoS One* **3**, e1609 (2008).

- 
48. Holtz, W.A. & O'Malley, K.L. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* **278**, 19367-19377 (2003).
  49. Ryu, E.J., *et al.* Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* **22**, 10690-10698 (2002).
  50. Berson, E.L. Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4526-4528 (1996).
  51. Colley, N.J., Baker, E.K., Stamnes, M.A. & Zuker, C.S. The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway. *Cell* **67**, 255-263 (1991).
  52. Colley, N.J., Cassill, J.A., Baker, E.K. & Zuker, C.S. Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent dominant retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3070-3074 (1995).
  53. Kurada, P. & O'Tousa, J.E. Retinal degeneration caused by dominant rhodopsin mutations in *Drosophila*. *Neuron* **14**, 571-579 (1995).
  54. Davidson, F.F. & Steller, H. Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature* **391**, 587-591 (1998).
  55. Ryoo, H.D., Domingos, P.M., Kang, M.J. & Steller, H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *The EMBO journal* **26**, 242-252 (2007).
  56. Stamnes, M.A., Shieh, B.H., Chuman, L., Harris, G.L. & Zuker, C.S. The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell* **65**, 219-227 (1991).
  57. Baker, E.K., Colley, N.J. & Zuker, C.S. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *The EMBO journal* **13**, 4886-4895 (1994).
  58. Lenhard, T. & Reilander, H. Engineering the folding pathway of insect cells: generation of a stably transformed insect cell line showing improved folding of a recombinant membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 823-830 (1997).



- 
59. Martin, T.F. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 231-264 (1998).
  60. Wei, H.C., *et al.* The Sac1 lipid phosphatase regulates cell shape change and the JNK cascade during dorsal closure in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, 1882-1887 (2003).
  61. Bainbridge, S.P. & Bownes, M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **66**, 57-80 (1981).
  62. Golic, K.G. Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* **252**, 958-961 (1991).
  63. Newsome, T.P., Asling, B. & Dickson, B.J. Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* **127**, 851-860 (2000).
  64. Vasselli, J.R., *et al.* Lack of retroperitoneal lymphadenopathy predicts survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* **166**, 68-72 (2001).
  65. Walther, R.F. & Pichaud, F. Immunofluorescent staining and imaging of the pupal and adult *Drosophila* visual system. *Nat Protoc* **1**, 2635-2642 (2006).
  66. Kumar, J.P. & Ready, D.F. Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* **121**, 4359-4370 (1995).
  67. Bushnell, D.M. & Martin, M.L. Quality of life and Parkinson's disease: translation and validation of the US Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39). *Qual Life Res* **8**, 345-350 (1999).
  68. Singleton, A.B., *et al.* alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**, 841 (2003).
  69. Bradbury, J. Alpha-synuclein gene triplication discovered in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **2**, 715 (2003).
  70. Farrer, M., *et al.* Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* **55**, 174-179 (2004).
  71. Petersen, A., Mani, K. & Brundin, P. Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol* **157**, 1-18 (1999).
  72. Cattaneo, E., Zuccato, C. & Tartari, M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* **6**, 919-930 (2005).

- 
73. Landles, C. & Bates, G.P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* **5**, 958-963 (2004).
  74. Brand, A.H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415 (1993).
  75. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular cloning : a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).
  76. Schneider, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**, 353-365 (1972).
  77. Rogers, S.L. & Rogers, G.C. Culture of *Drosophila* S2 cells and their use for RNAi-mediated loss-of-function studies and immunofluorescence microscopy. *Nat Protoc* **3**, 606-611 (2008).
  78. Feany, M.B. & Bender, W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394-398 (2000).
  79. Pesah, Y., *et al.* Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in *Drosophila*. *Genesis* **41**, 154-159 (2005).
  80. Gaengel, K. & Mlodzik, M. Microscopic analysis of the adult *Drosophila* retina using semithin plastic sections. *Methods Mol Biol* **420**, 277-287 (2008).
  81. Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M. & Park, C.B. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett* **579**, 4775-4780 (2005).
  82. Beranger, F., Crozet, C., Goldsborough, A. & Lehmann, S. Trehalose impairs aggregation of PrPSc molecules and protects prion-infected cells against oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 44-48 (2008).
  83. Le Bourg, E. & Lints, F.A. Hypergravity and aging in *Drosophila melanogaster*. 4. Climbing activity. *Gerontology* **38**, 59-64 (1992).

## Anexo

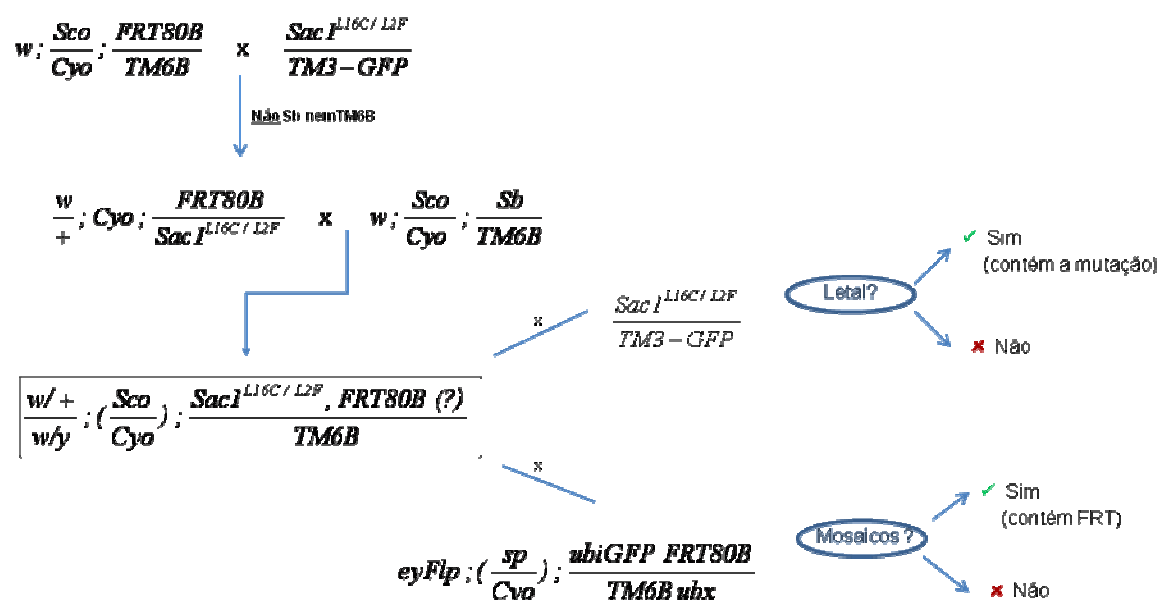
### 2. Genes candidatos a moduladores da via IRE1/Xbp1

**Tabela 1. Genes que sofrem um significativo aumento de expressão em olhos de *Drosophila* que sobre-expressam Xbp1<sub>spliced</sub>**

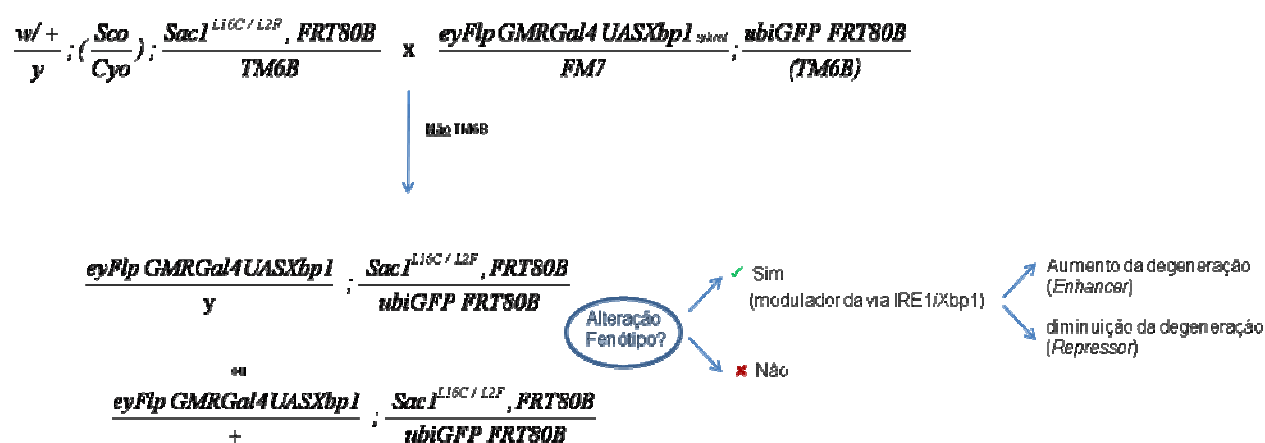
Genbank	FlyBase	Descrição	Factor de Aumento
CG9313-RA	FBgn0034566		57.82
HDC12547			49.74
CG6362-RA	FBgn0028740		27.68
CG10812-RA	FBgn0035434	drosomycin-5	24.31
CG1077-RA	FBgn0037405		23.41
CG11942-RA	FBgn0031074		23.31
CG11639-RA	FBgn0040338		20.28
CG10184-RA	FBgn0039094		20.03
CG13855-RA	FBgn0038960		17.8
CG3966-RA	FBgn0002936	neither inactivation nor afterpotential A	17.72
CG14443-RA	FBgn0029880		16.48
CG17732-RA	FBgn0036923		14.45
CG13324-RA	FBgn0033789		11.79
CG15231-RA	FBgn0040653	Immune induced molecule 4	10.97
CT34163	FBgn0033039		8.881
CG12934-RA	FBgn0033541		8.317
CG6788-RA	FBgn0052496 ; FBgn0030880		7.894
CG13732-RA	FBgn0036730		7.893
CG13741-RA	FBgn0033374 ; FBgn0033373		7.865
CG31439-RA	FBgn0051439		7.845
CG10725-RB	FBgn0036362		7.822
CG6614-RA	FBgn0032369		7.747
CG16789-RA	FBgn0037712		7.686
CG3158-RA	FBgn0003483	spindle E	7.686
CG14662-RA	FBgn0037291		7.612
CG7236-RA	FBgn0031730		7.564
CG7567-RA	FBgn0039670		7.55
CG9254-RA	FBgn0028513		7.243
CG8136-RA	FBgn0037616		7.149

## 2.2.2. Cruzamentos e Genética

### i. Recombinação das mutações de *Sac1* com cromossomas FRT



### ii. Efeito das mutações de *Sac1* no fenótipo “glossy”



## iv. Expressão de NinaA em clones mutantes de IRE1 no olho

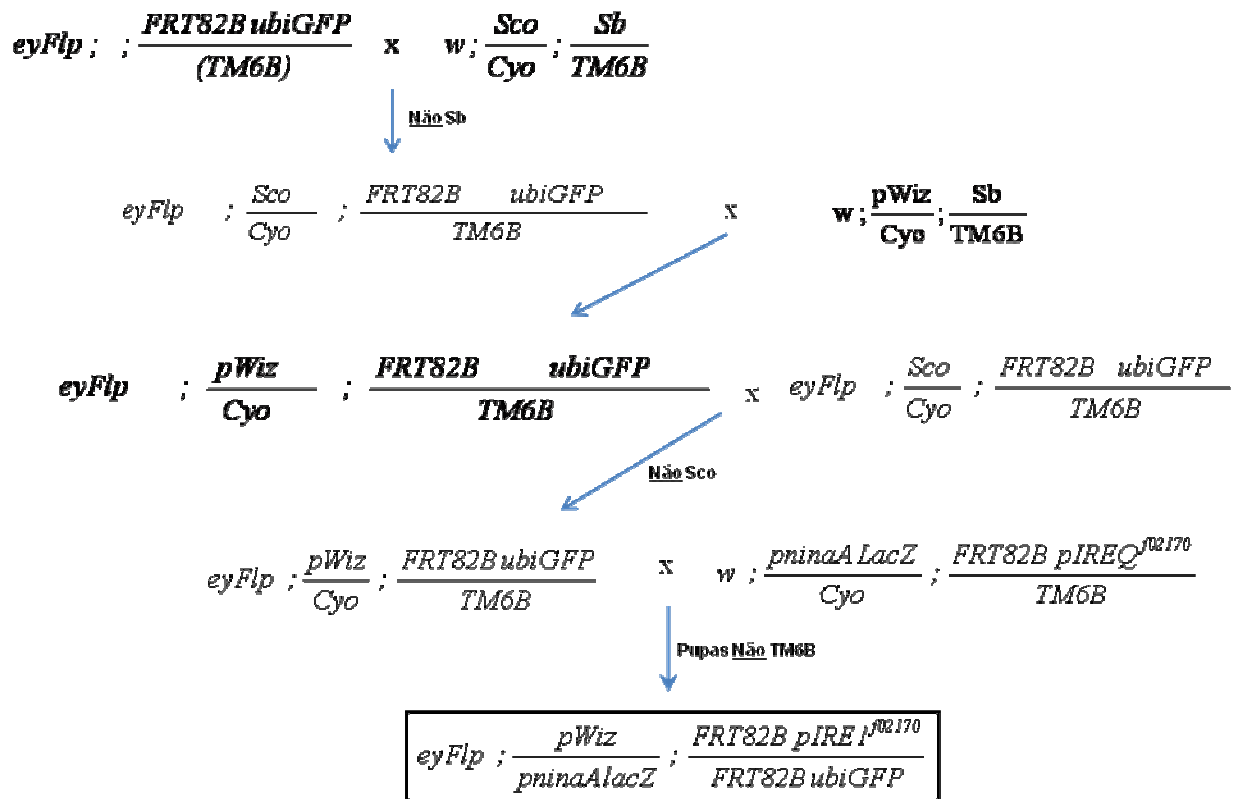
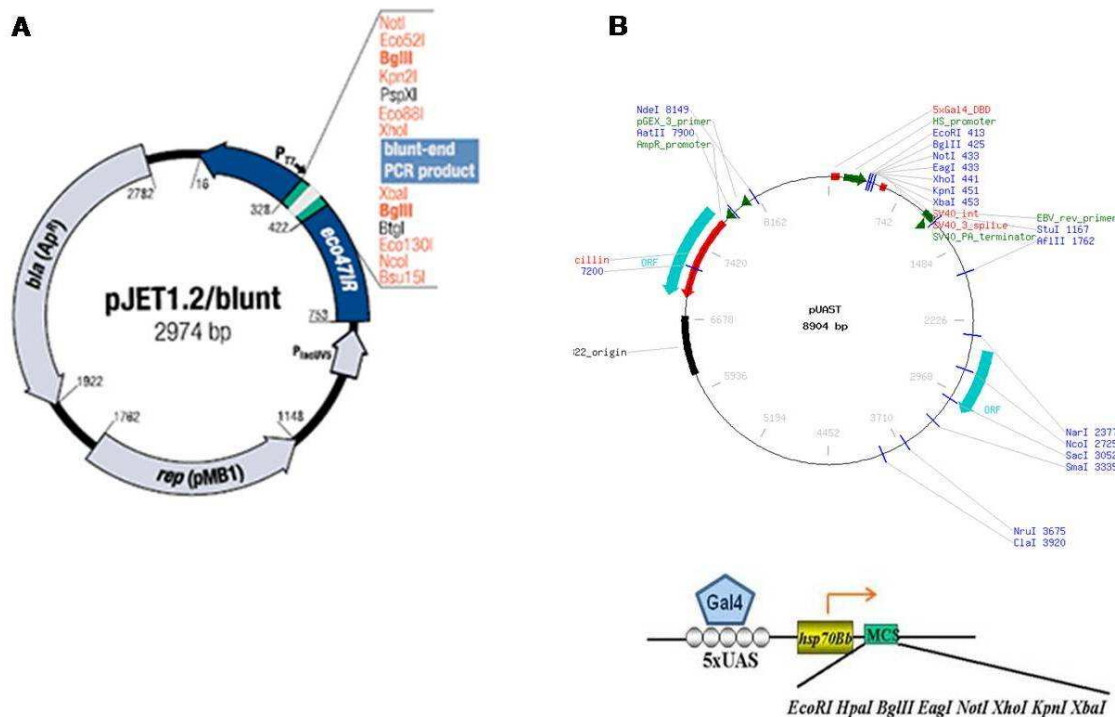


Tabela 2. Oligonucleótidos utilizados nas reacções de RT-PCR

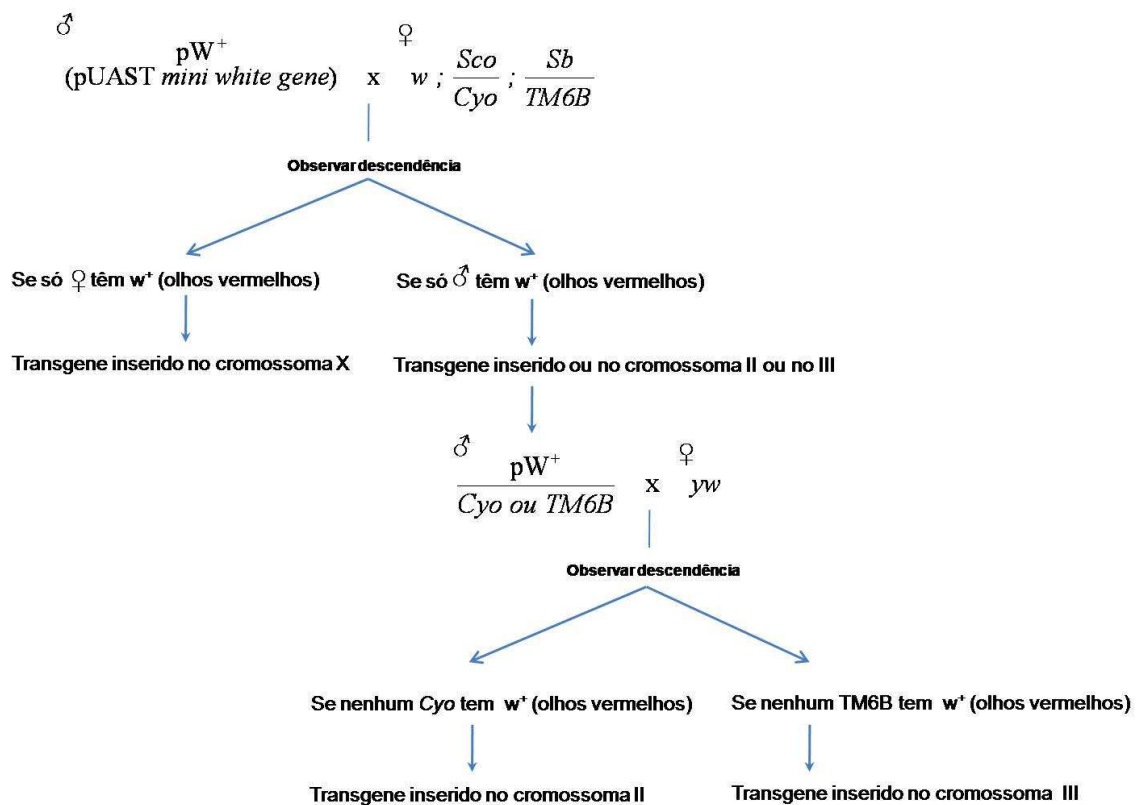
Nome	Sequência
F ninaA	5' CGT GGA CAG TGG TCT GAG CTT CAC 3'
R ninaA	5' CTC CAC CGC CAG AGC CTT ATC CTC 3'
F RP49	5' GTC TGG GTC ACG GAT TCG TGA ACT ACG TG 3'
R RP49	5' GCC ACA GCA CGT TCT CCT CGG TAT CGG 3'



**Tabela 3. Oligonucleótidos utilizados nas reacções de PCR para subclonagem.** Estes oligonucleótidos contêm na sua extremidade 5' sequências correspondentes a locais de restrição das enzimas *Bgl* II e *Acc* 65I (a sublinhado).

Nome	Sequência
F $\alpha$ Syn	5' GC GA <u>AGATCT</u> ATGGATGTATTCAT GAAAGG 3'
R $\alpha$ Syn	5' GC GG <u>CCATGG</u> TTAGGCTTCAGGTTCGTAG 3'
F $\alpha$ Syn-EGFP	5' GC GA <u>AGATCT</u> ATGGATGTATTCAT GAAAGG 3'
R $\alpha$ Syn-EGFP	5' GC GG <u>CCATGG</u> TTA <del>CT</del> TGTACAGCTCG TCCA 3'
F EGFP- $\alpha$ Syn	5' GC GA <u>AGATCT</u> ATGCTGGTGAGCAAGGGC 3'
R EGFP- $\alpha$ Syn	5' GC GG <u>CCATGG</u> TTAGGCTTCAGGTTCGTAG 3'
F Htt25Q/103Q	5' GC GA <u>AGATCT</u> ATGGCGACCCTG GAAAAGC 3'
R Htt25Q/103Q	5' GC GG <u>CCATGG</u> TTA <del>CT</del> TGTACAGCTCG TCCA 3'

### 3.2.3. Mapeamento das inserções nas linhas UAS



**Tabela 4. Linhas transgênicas UAS independentes**

<b>Linha Transgênica</b>	<b>Inserção (cromossoma)</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Observações</b>
UAS Htt25Q-GFP <sup>1</sup>	3	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>1</sup> / TM6B</i>	Letalidade ainda não confirmada
UAS Htt25Q-GFP <sup>2</sup>	?	?	Inserção ainda não mapeada
UAS Htt25Q-GFP <sup>3</sup>	2	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>3</sup> / (Cyo)</i>	
UAS Htt25Q-GFP <sup>4</sup>	3	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>4</sup> / (TM6B)</i>	
UAS Htt25Q-GFP <sup>5</sup>	3	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>5</sup> / TM6B</i>	
UAS Htt25Q-GFP <sup>6</sup>	2	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>6</sup> / (Cyo)</i>	
UAS Htt25Q-GFP <sup>7</sup>	2	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>7</sup> / Cyo</i>	Letalidade ainda não confirmada
UAS Htt25Q-GFP <sup>8</sup>	?	?	A estabelecer stock de transformantes
UAS Htt25Q-GFP <sup>9</sup>	3	<i>UAS Htt25Q-GFP<sup>9</sup> / TM6B</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>1</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>1</sup> / TM6B</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>2</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>2</sup> / TM6B</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>3</sup>	—	—	Linha perdida
UAS Htt103Q-GFP <sup>4</sup>	2	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>4</sup> / (Cyo)</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>5</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>5</sup> / TM6B</i>	Letalidade ainda não confirmada
UAS Htt103Q-GFP <sup>6a/6b</sup>	2, 3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>5</sup> / Cyo ou TM6B</i>	2 linhas independentes
UAS Htt103Q-GFP <sup>7</sup>	?	?	A estabelecer stock de transformantes
UAS Htt103Q-GFP <sup>8</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>8</sup> / (TM6B)</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>9</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>9</sup> / (TM6B)</i>	
UAS Htt103Q-GFP <sup>10</sup>	3	<i>UAS Htt103Q-GFP<sup>10</sup> / (TM6B)</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>1</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>1</sup> / Cyo</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>2</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>2</sup> / (Cyo)</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>3</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>3</sup> / (Cyo)</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>4</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>4</sup> / (Cyo)</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>5</sup>	3	<i>UAS αSyn-GFP<sup>5</sup> / TM6B</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>6</sup>	?	?	Múltiplas inserções
UAS αSyn-GFP <sup>7</sup>	?	<i>UAS αSyn-GFP<sup>7</sup> / Cyo</i>	A estabelecer stock de transformantes
UAS αSyn-GFP <sup>8</sup>	3	<i>UAS αSyn-GFP<sup>8</sup> / TM6B</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>9</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>9</sup> / Cyo</i>	
UAS αSyn-GFP <sup>10</sup>	2	<i>UAS αSyn-GFP<sup>10</sup> / (Cyo)</i>	



#### 4.1.5. Expressão das proteínas associadas às DP e DH no olho de *Drosophila*

$$\frac{pW^+}{Cyo \text{ ou } TM6B} \times w; GMRGal4; Sb/TM6B$$

|

Analisar efeitos de neurodegeneração na retina